

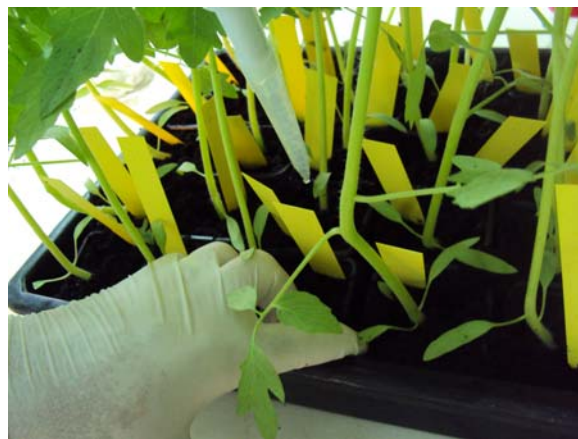
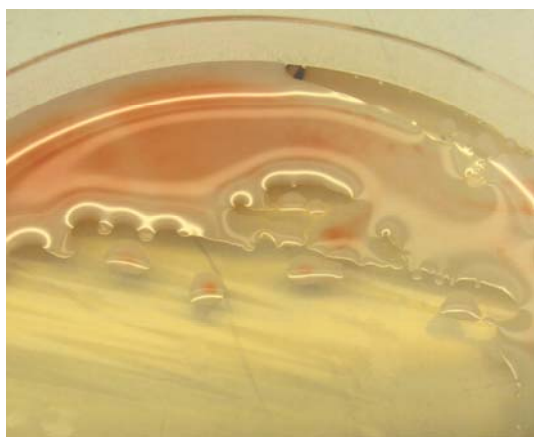
Mémoire de fin d'études présenté pour l'obtention du
Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques,
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage

Spécialité : Horticulture
Option : Santé du Végétal et Environnement (SEVE)

**Exploration des facteurs génétiques liés à la spécificité de
virulence de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine et tomate**

Par : **Flora Penséc**

Stage effectué du 18 mars au 2 septembre 2010



JURY

Soutenu à Angers, le 14 Septembre 2010

Président : Jean-Charles MICHEL

Maître de stage : Emmanuel WICKER

Tuteur : Stéphane POUSSIER

Enseignants responsables de l'option : Jean-Charles MICHEL, Stéphane POUSSIER

Autres membres du jury : Tristan BOUREAU
Florence VAL

Diffusion du mémoire

A remplir par l'auteur avec le maître de stage.

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité ⁽¹⁾ :

Mémoire de fin d'études :

Consultable sur place :	<input checked="" type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non		
Reproduction autorisée :	<input checked="" type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non		
Prêt autorisé :	<input checked="" type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non		
Confidentialité absolue : (ni consultation, ni prêt)	<input type="checkbox"/> oui	<input checked="" type="checkbox"/> non		
ans	Si oui	<input type="checkbox"/> 1 an	<input type="checkbox"/> 5 ans	<input type="checkbox"/> 10
Diffusion de la version numérique :	<input checked="" type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non		

Fiche de résumé du mémoire de fin d'études :

Résumé diffusable :	<input checked="" type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
---------------------	---	------------------------------

Si oui, l'auteur complète l'autorisation suivante :

Je soussignée Flora Pensec, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date : Signature :

Angers, le

Le Maître de stage⁽²⁾,

L'auteur,

L'Enseignant responsable d'option⁽²⁾,

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation du Centre d'Angers d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement **Emmanuel Wicker** pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans d'excellentes conditions. Sa pédagogie, sa disponibilité et sa passion pour son travail m'ont permis de m'impliquer rapidement et d'exprimer ma vision du sujet ; et cela m'a conforté dans l'idée que je veux orienter ma carrière dans la recherche.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « Ralsto » : **Philippe Prior, Jacques Dintinger, Benoît Remenant, Aurore Lebeau, Carine N'Guessan, Gilles Cellier et Matthieu Gouy** pour les échanges et discussions très enrichissants lors des réunions, au labo ou entre deux portes ! Et je suis particulièrement reconnaissante aux techniciens dont l'aide m'a été très précieuse pour réaliser mes expérimentations. **Sylvain Lebon et Jean-Michel Baptiste** m'ont permis de travailler avec du matériel végétal de qualité et dans la bonne humeur. **Jean-Jacques Cheron** m'a formée aux techniques de microbiologie avec patience et ses conseils me permettront de travailler efficacement et avec organisation.

Merci également à l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées au sein du Pôle de Protection des Plantes, et particulièrement aux **stagiaires** avec qui j'ai pu découvrir les magnifiques paysages de l'île de la Réunion et partager des expériences inoubliables.

Enfin je voulais remercier **Stéphane Poussier** pour m'avoir conseillé ce stage et pour ses réflexions et conseils lors de notre réunion au Congrès de l'ICPPB à St Denis à la Réunion ; ainsi que les membres du jury **Tristan Boureau et Florence Val** qui ont accepté de s'intéresser à mon travail.

Lexique des abréviations :

ACURs: Régions à biais d'usage de codons (*Alternative Codon Usage Region*)
AFC: Analyse Factorielle des Correspondances
ANOVA: Analyse de la variance (*ANalysis Of VAriance*)
AUDPC: Aire sous la courbe de progression de la maladie (*Area Under the Disease Progress Curve*)
CFU : Unité de formation de colonies (*Colony Forming Unit*)
CGH: Hybridation génomique comparative (*Comparative Genomic Hybridization*)
core-TEP: Collection de cultivars de Tomate, Aubergine et Piment
core-RS2 : Collection de souches mondialement connues et représentatives de la diversité des phylotypes I,II et III
Egl: Endoglucanase
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EPS: Exopolysaccharides
ETI: Immunité déclenchée par effecteurs (*Effector-Triggered Immunity*)
ETS: Sensibilité liée aux effecteurs (*Effector-Triggered Susceptibility*)
HR: Réaction d'hypersensibilité (*Hypersensitivity Response*)
hrp: Gène associé à la pathogénicité et à la réponse d'hypersensibilité (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*)
MLSA: Analyse de séquences multilocus (*MultiLocus Sequence Analysis*)
MLST: Typage de séquences multilocus (*MultiLocus Sequence Typing*)
NPB: Non Pathogène sur Bananier
OEPP: Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes
ONPV: Organisation Nationale de Protection des Végétaux
PAMPs: Motif moléculaire associé à l'agent pathogène (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)
PCR: Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)
PR: Protéine de Résistance
PRRs: Récepteurs de reconnaissance de motifs (*Pattern Recognition Receptors*)
PTI: Immunité déclenchée par les PAMPs (*PAMP-triggered immunity*)
QTL: Loci à effet quantitatif (*Quantitative Trait Loci*)
RFLP: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment length Polymorphism*)
T3Es: Effecteurs de Type 3 (*Type 3 Effectors*)
T3SS : Système de Sécrétion de Type 3 (*Type 3 Secretion System*)
UE: Union Européenne

Liste des figures :

- Figure 1 : Symptômes de flétrissement bactérien sur tomate, aubergine, pomme de terre et bananier
- Figure 2 : Cycle infectieux de *R. solanacearum*
- Figure 3 : Test de l'eau : détection de *R. solanacearum*
- Figure 4 : Colonies muqueuses et colonies rugueuses de *R. solanacearum*
- Figure 5 : Structure de la bactérie
- Figure 6 : Classification au sein du complexe d'espèces de *R. solanacearum*
- Figure 7 : Les différents systèmes de sécrétion
- Figure 8 : Modèle des réseaux de régulation chez *R. solanacearum*
- Figure 9 : Le modèle en zig-zag : illustration de l'efficacité du système immunitaire des plantes
- Figure 10 : Modèle simplifié de la cascade de régulation *hrp* chez *R. solanacearum*
- Figure 11 : Interactions entre les effecteurs de type 3 et les protéines R de la plante
- Figure 12 : Effet de la mutation du gène *popP2* sur le phénotype sur *Arabidopsis thaliana*
- Figure 13 : Disposition des plants dans le rotoplant et numérotation dans une terrine
- Figure 14 : Isolation des terrines contenant des plants inoculés avec des souches différentes
- Figure 15 : Méthode d'inoculation des plants : scarification au scalpel et ajout de la suspension de bactéries
- Figure 16 : Evaluation des symptômes sur aubergine : notation 0, notation 1, notation 2, notation 3, notation 4
- Figure 17 : Evaluation des symptômes sur tomate : notation 0, notation 1, notation 2, notation 3, notation 4
- Figure 18 : Evaluation des infections latentes : section d'une tige de plant inoculé, diffusion des bactéries dans le Tris, développement de la bactérie après étalement sur milieu de la suspension
- Figure 19 : Apparition de bandes aspécifiques lors de l'amplification d'un T3E chez différentes souches
- Figure 20 : Dessin d'amorces sur un groupe d'orthologues de taille différente
- Figure 21 : Classification hiérarchique ascendante des souches selon leur répertoire d'effecteurs : distinction de 6 groupes
- Figure 22 : Histogrammes des taux de flétrissement, taux de colonisation et AUDPC pour chaque cultivar
- Figure 23 : Arbres réalisés à partir des données phénotypiques par cultivar
- Figure 24 : Classification hiérarchique des souches inoculées selon leur composition en effecteurs de type 3
- Figure 25 : Arbres de classification, par cultivar, des souches selon leur composition en effecteurs de type 3 les plus associés au phénotype.
- Figure 26 : Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur E1, d'après une analyse factorielle des correspondances
- Figure 27 : Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur E6, d'après une analyse factorielle des correspondances
- Figure 28 : Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur T5, d'après une analyse factorielle des correspondances
- Figure 29 : Schéma récapitulatif de la démarche adoptée

Liste des tableaux :

Tableau 1: Variations dans la distribution des gènes codant pour des effecteurs de type 3 chez cinq souches appartenant au phylotype III

Tableau 2: Distribution des gènes candidats étudiés et association de ces gènes à des phénotypes

Tableau 3: Liste des souches de la core –RS2

Tableau 4: Liste des souches réunionnaises

Tableau 5: Liste des plants de la core-TEP utilisés

Tableau 6: Réactifs utilisés dans les mix (1 réaction)

Tableau 7: Programmation de la PCR

Tableau 8 : Concentration des différentes solutions d'inoculation

Tableau 9: Association des effecteurs à un phylotype

Tableau 10: Présence (1)/ absence (0) des différents effecteurs au sein des collections de souches

Tableau 11: Polymorphisme de longueur des différents effecteurs au sein des collections de souches

Tableau 12: Lien entre le répertoire d'effecteurs (groupe) et le phylotype des souches

Tableau 13: Valeurs des probabilités critiques permettant de comparer les deux dates d'inoculation

Tableau 14: Classes de virulence par cultivar pour les différentes souches

Tableau 15: Correspondance entre les effecteurs et les phénotypes associés dans cette étude et dans l'étude de Lebeau *et al.*, 2010.

Tableau 16 : Comparaison des classes de virulence de cette étude avec celles de Lebeau *et al.*, 2010

Sommaire

A. Introduction bibliographique

I. <i>Ralstonia solanacearum</i> , une bactérie responsable du flétrissement bactérien et présente sur une large gamme d'hôtes.....	1
1. La gamme d'hôtes	1
2. Le flétrissement bactérien : symptômes, cycle infectieux.....	1
II. L'agent pathogène <i>Ralstonia solanacearum</i>	2
1. Présentation de la bactérie : structure et formes.....	2
2. Taxonomie et phylogénie de la bactérie	3
3. Les facteurs de virulence chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	4
III. La lutte contre la bactérie	5
1. Les moyens de lutte disponibles : lutte réglementaire, lutte prophylactique, lutte culturale, lutte physique et chimique.....	5
2. La lutte génétique : sélection et utilisation de variétés résistantes.....	7
IV. Les effecteurs de type 3 expliquent-ils les phénotypes de virulence ou d'avirulence sur plants ?.....	9
1. Présentation des effecteurs de type 3 (T3Es).....	9
2. Etat des connaissances sur la distribution des T3E chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	10
3. Avancées des recherches sur la détermination du phénotype de virulence par les T3Es chez d'autres organismes.....	12
V. Le contexte et la problématique du stage.....	12
1. Le contexte, démarche initiale.....	12
2. La problématique et les objectifs.....	13

B. Matériel et méthodes

I. Les souches bactériennes.....	14
1. La collection de souches de la core-RS2	14
2. La collection de souches réunionnaises	14
3. L'isolement des souches et l'extraction d'ADN.....	14
II. Le matériel végétal.....	14
1. Aubergine (<i>Solanum melongena</i>): les accessions sensibles et résistantes.....	14
2. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>): les accessions sensibles et résistantes.....	14
III. La sélection des T3Es et l'amplification par PCR, étude du génotype.....	15
1. Réalisation d'une liste de gènes orthologues aux T3Es candidats.....	15
2. Détermination d'amorces	15
3. Amplifications par PCR.....	15
IV. Les tests de pathogénicité : étude du phénotype.....	16
1. Les conditions de croissance des plants.....	16
2. Le dispositif d'expérimentation.....	16
3. La méthode d'inoculation des plants.....	16
4. L'évaluation du développement de la maladie.....	17
V. L'analyse des données.....	18
1. Réalisation des groupes de souches aux contenus en effecteurs similaires.....	18
2. Reproductibilité des données des deux dates d'inoculation.....	18
3. Distinction des valeurs des taux de flétrissement, taux de colonisation et AUDPC entre les souches.....	18
4. Typologie phénotypique des souches utilisées pour l'inoculation.....	19
5. L'analyse factorielle des correspondances entre les phénotypes et les effecteurs.....	19

C. Résultats

I.	Les données génotypiques : présence et polymorphisme des gènes candidats.....	20
1.	Mise en évidence de la présence des gènes étudiés dans la collection de souches.....	20
2.	Etude des gènes présents : polymorphisme de longueur allélique.....	21
3.	Réalisation de groupes de souches au contenu similaire en T3Es.....	21
4.	Relation entre le répertoire d'effecteurs et le phylotype des souches.....	22
II.	Les données phénotypiques : taux de flétrissement, indice de colonisation, aire sous la courbe de développement de la maladie (AUDPC).....	22
1.	Reproductibilité des données des deux inoculations.....	22
2.	Analyse des données obtenues sur plants sensibles (T10 et E8).....	23
3.	Analyse des données obtenues sur plants résistants (T5, E1 et E6).....	23
4.	Réalisation de groupes de souches au phénotype similaire.....	24
III.	Confrontation des données phénotypiques et génotypiques.....	24
1.	Comparaison des classifications phénotypiques et de la classification génotypique.....	24
2.	Identification des effecteurs les plus associés aux phénotypes.....	24

D. Discussion

I.	La distribution des effecteurs se structure en six profils.....	26
II.	Certains effecteurs sont associés à des phénotypes tranchés sur les cultivars étudiés.....	27
III.	Bilan sur la méthodologie adoptée.....	28
1.	Reproductibilité des données des deux inoculations.....	28
2.	Les apports du séquençage des gènes présents à la fois chez des souches virulentes et avirulentes.....	29
IV.	Originalité de cette étude et le bilan sur les effecteurs de type 3 connus.....	29
1.	L'originalité et les apports de cette étude.....	29
2.	Bilan sur les gènes connus.....	30
V.	Perspectives de l'étude.....	31

<u>Références bibliographiques</u>	32
---	----

Liste des annexes

A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1 : Symptômes de flétrissement bactérien sur (de gauche à droite) tomate (Photo : Flora Pensac), **aubergine** (Photo : Flora Pensac), **pomme de terre** (www.erails.net), **bananier** (www.cns.fr)

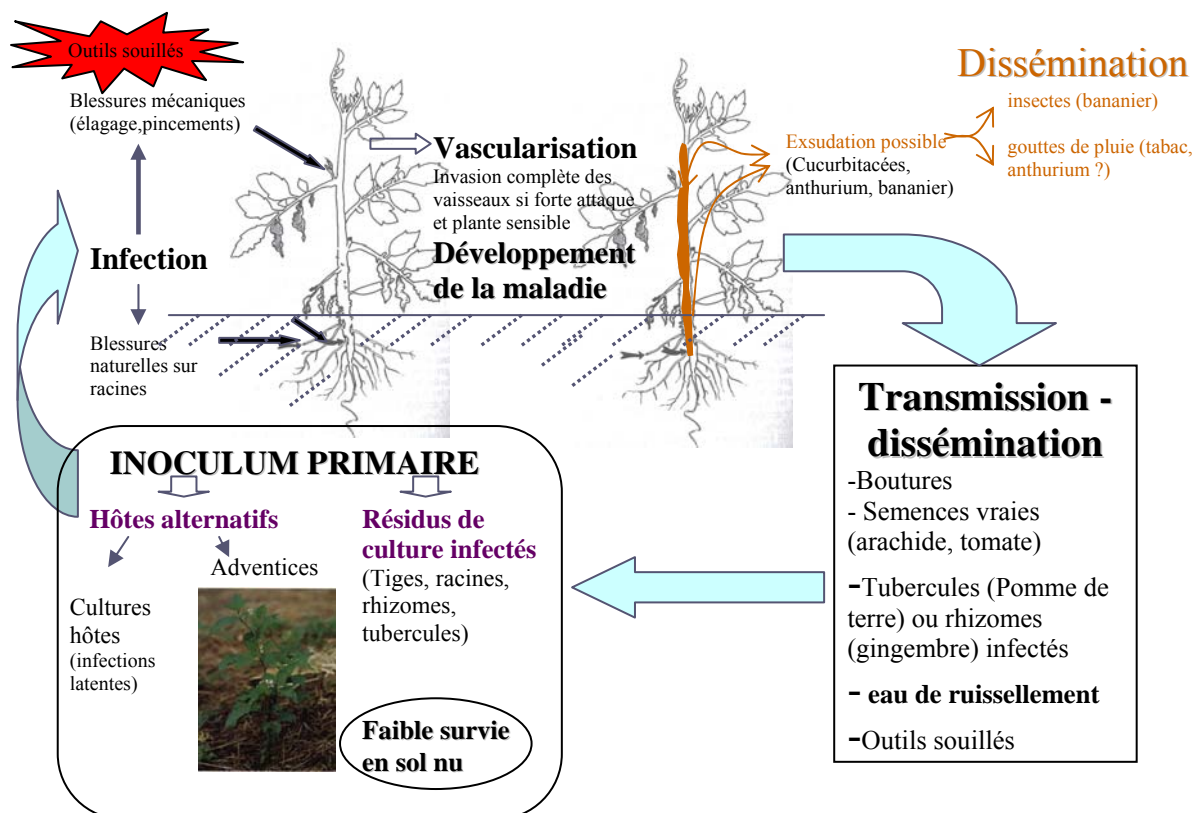


Figure 2 : Cycle infectieux de *R. solanacearum* (Wicker, 2004)

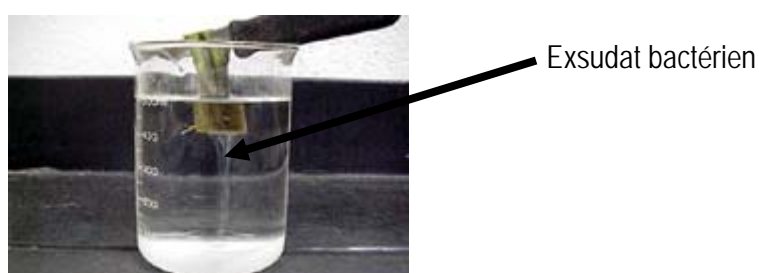


Figure 3 : Test de l'eau : détection de *R. solanacearum* (Williamson, 2002)

I. *Ralstonia solanacearum*, une bactérie responsable du flétrissement bactérien et présente sur une large gamme d'hôtes

1. La gamme d'hôtes

R. solanacearum est une bactérie tellurique de la famille des Burkholderiacées (classe des Beta-Protéobactéries) à la taxonomie complexe, capable d'infecter 250 espèces hôtes et 54 familles chez les monocotylédones et dicotylédones (Hayward, 1994). Elle ne présente pas de pathovar particulier (gamme d'hôtes).

Primitivement décrite sur Solanacées (tomate, aubergine, tabac, poivron, piment, pomme de terre...), elle a également été identifiée comme agent pathogène des Musacées (bananier dessert et plantain, Heliconia), Aracées (Anthurium), Cucurbitacées mais aussi du gingembre et du mûrier.

Elle est présente partout dans les zones tropicales, subtropicales, dans les zones tropicales d'altitude et émerge dans les zones tempérées.

2. Le flétrissement bactérien : symptômes, cycle infectieux

Le symptôme caractéristique de la maladie est le flétrissement irréversible de la plante (Poussier, 2000). L'intensité des symptômes et leur vitesse d'apparition sont fonction de l'hôte (âge, espèce et cultivar), du potentiel d'inoculum (qualité, quantité) et des conditions environnementales (température, humidité, type de sol ...).

R. solanacearum est une bactérie hémibiotrophe, elle réalise d'abord une phase de biotrophie pendant laquelle elle détruit les cellules végétales et s'en nourrit, et réalise ensuite une phase nécrotrophe (Collmer *et al.*, 2009).

Le processus infectieux débute par la pénétration du germe tellurique au niveau des racines grâce aux ouvertures naturelles (Kelman and Sequeira, 1965) ou blessures. La bactérie colonise ensuite les espaces intercellulaires, puis les vaisseaux du xylème (Vasse *et al.*, 1995) où elle se multiplie et synthétise des exopolysaccharides (EPS) et des enzymes de dégradation des parois. Ceci empêche la circulation de l'eau dans la plante et provoque donc un flétrissement des feuilles (Figure 1). Les feuilles les plus jeunes jaunissent partiellement puis flétrissent (Wallis and Truter, 1978) jusqu'à la mort de la plante entière (Figure 2). Lors d'une infection importante, les tissus vasculaires de la tige prennent une teinte brune, et l'infestation de la tige peut être visualisée par le test de l'eau (fragment de la base de la tige placé dans un volume d'eau) avec la libération d'un exsudat bactérien blanchâtre (Mc Carter, 1991), (Figure 3). Sur tomate, des bourrelets et des racines adventives peuvent apparaître sur la tige, conséquence de l'accumulation d'acide indole acétique dans les cellules végétales.

La dissémination à grande échelle de *R. solanacearum* est principalement due à l'homme via l'utilisation et le transport de matériel contaminé ou lors d'interventions culturales. A l'échelle de la parcelle, cette bactérie tellurique se transmet également de racine à racine par les eaux de ruissellement et d'irrigation, mais aussi par insectes dans le cas de la maladie de Moko (Buddenhagen and Elsasser, 1962).

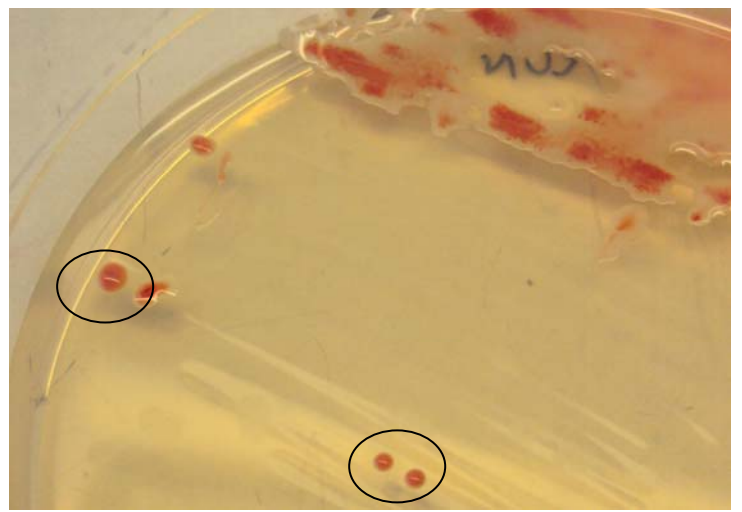
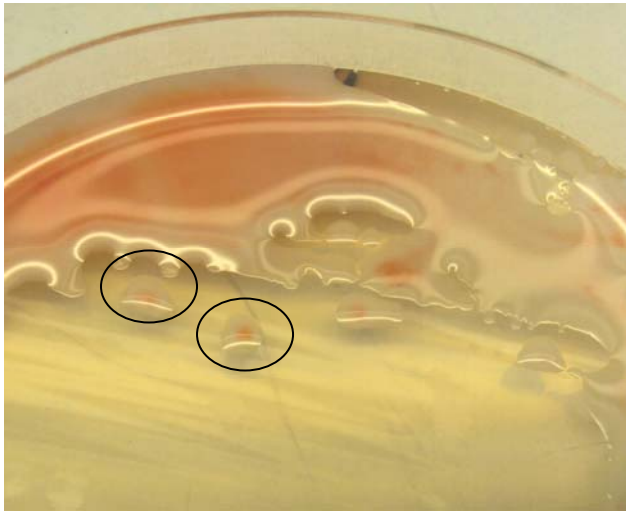


Figure 4 : Colonies muqueuses (à gauche) et colonies rugueuses (à droite) de *R. solanacearum*, (Photo : Flora Pensec)

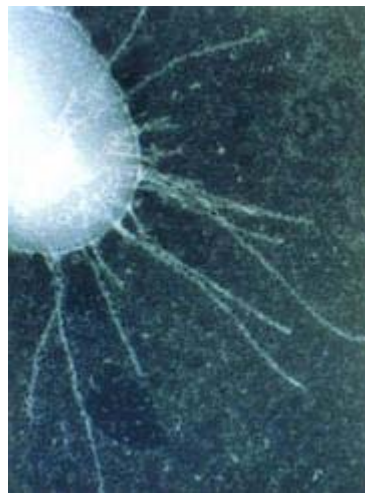


Figure 5 : Structure de la bactérie (C. Boucher et J. Vasse, www.cns.fr)

II. L'agent pathogène *Ralstonia solanacearum*

1. Présentation de la bactérie : structure et formes

Cet organisme a été décrit pour la première fois en 1896 aux Etats-Unis par Smith en tant que *Bacillus solanacearum*. En 1914, c'est sous le nom de *Pseudomonas solanaceum* (Smith) qu'est désignée cette bactérie. Grâce à l'évolution des techniques de biologie moléculaire, cette appellation devient *Burkholderia solanacearum* en 1992 (Yabuuchi *et al.*, 1992) et aujourd'hui *Ralstonia solanacearum*, validé en 1995 (Yabuuchi *et al.*, 1995).

1.1. La structure du génome

Un génome bipartite. Le séquençage de la souche mondialement connue GMI1000 a établi que le génome de cet organisme est organisé en deux larges réplicons circulaires de 3.7 et 2.1 mégabases, respectivement le chromosome et le mégaplasme (Salanoubat *et al.*, 2002). Le mégaplasme apparaît chez toutes les souches connues de *R.solanacearum* (Genin and Boucher, 2004). La plupart des gènes de ménage se trouvent sur le chromosome, tandis que le plasmide contient des gènes associés à l'adaptation à l'environnement et à la pathogénie. Ces deux réplicons partagent une longue coévolution, signe que le mégaplasme a été acquis très anciennement (Guidot *et al.*, 2007).

Une structure en mosaïque. La bactérie contient des zones riches en bases GC disséminées sur les deux réplicons et souvent associées à des ARNt ou à des éléments génétiques mobiles (Salanoubat *et al.*, 2002). Ceci indiquerait que ces régions ont été acquises par transfert latéral de gènes et joueraient un rôle important dans l'adaptation rapide de la bactérie aux changements environnementaux (Genin and Boucher, 2004). Le génome de *R. solanacearum* contient également des régions avec des biais d'usage des codons (Alternative Codon Usage Regions, ACURs), (Guidot *et al.*, 2007).

1.2. Les caractéristiques biologiques

Les différentes formes de la bactérie. En culture sur milieu Kelman, les colonies présentent un aspect muqueux dû à la production d'exopolysaccharides, de forme ovoïde, de couleur blanc crème avec une coloration rose-rouge au centre (pigmentation au formazan). Cette forme muqueuse est généralement associée à la virulence (Figure 4). Par contre, sur milieu Kelman, la forme rugueuse présente de petites colonies non virulentes, rondes et de couleur rouge vif (Figure 4) (Kelman, 1954).

Motilité et adhésion bactérienne. *R. solanacearum* possède un flagelle polaire principal responsable de sa motilité dans l'eau (Tans-Kersten *et al.*, 2001). Elle produit aussi un pilus de type IV déterminant la « motilité par tressautement », lui permettant une translocation indépendante du flagelle sur les surfaces solides (Liu *et al.*, 2001). L'étude du génome de GMI1000 suggère que *R. solanacearum* produit de multiples structures de pili (Figure 5).

Une bactérie saprophyte du sol au métabolisme versatile. *R.solanacearum* est une bactérie saprophytique capable de survivre pendant de longues périodes dans divers habitats naturels comme des eaux de surface et différents types de sols. Cette capacité requiert des fonctions spécifiques lui permettant d'utiliser divers substrats organiques comme source d'énergie et de faire face aux composés toxiques souvent présents dans les sols. Ces réactions cataboliques permettent d'utiliser une grande diversité de substrats (aminoacides, sucres, acides gras...). La bactérie produit aussi des enzymes hydrolytiques extracellulaires et un large répertoire de transporteurs liés à l'import de substrats métabolisables ou à l'export des composés toxiques hors de la cellule (Gonzales and Allen, 2003).

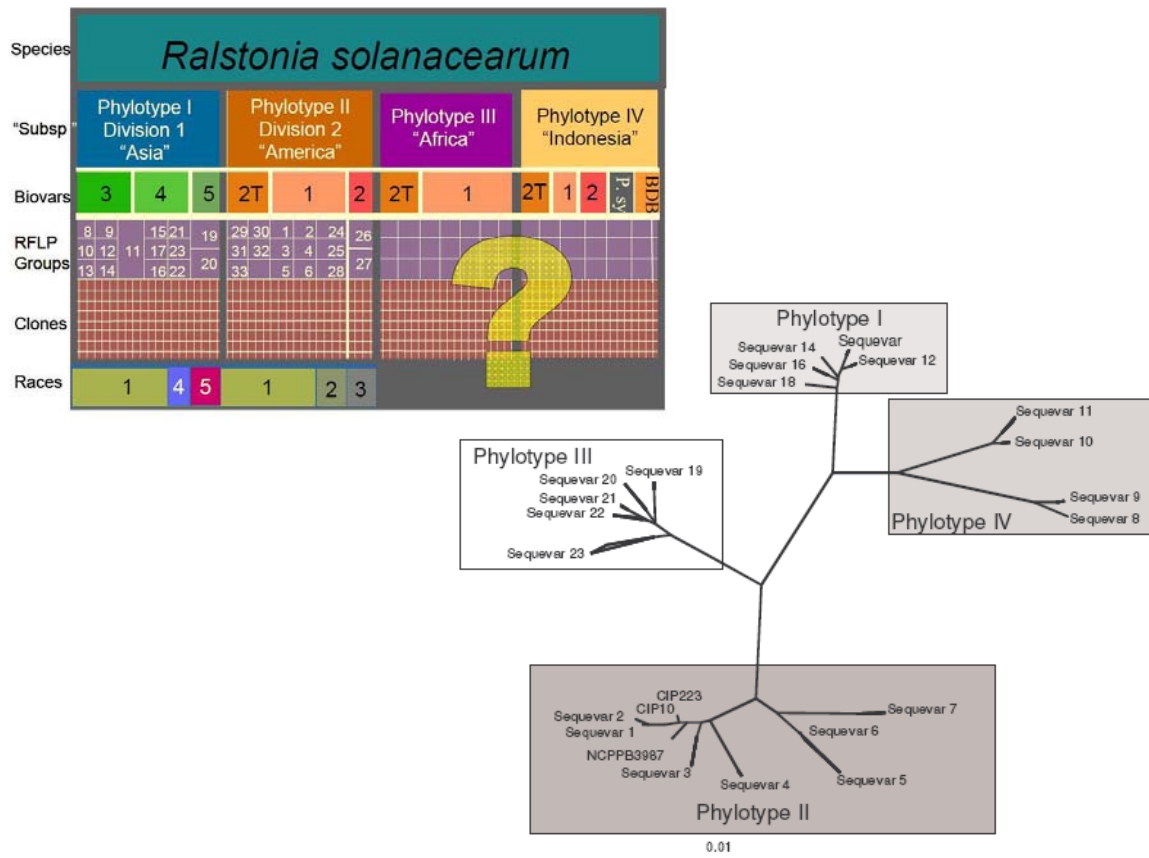


Figure 6 : Classification au sein du complexe d'espèces de *R. solanacearum* (Fegan and Prior, 2005)

2. Taxonomie et phylogénie de la bactérie

2.1. Une classification initiale en races et biovars

R. solanacearum présente une forte variabilité phénotypique et génotypique qui a mené la communauté scientifique à la considérer comme un complexe d'espèces (Gillings and Fahy, 1994).

Cinq **races** ont été définies selon des critères de pathogénicité sur leur spectre d'hôte :

- Race 1 : race polyphage regroupant les souches pathogènes sur la plupart des solanacées, bananiers diploïdes
- Race 2 : spécifique aux musacées, responsable de la maladie de Moko
- Race 3 : restreinte aux solanacées et capable de se développer et d'être pathogène à des températures tempérées (18-20°C)(Buddenhagen *et al.*, 1962)
- Race 4 : pathogène du gingembre (Pegg and Moffet, 1971)
- Race 5 : inféodée au mûrier (He *et al.*, 1983)

Cependant, cette classification n'est pas représentative de la variabilité de l'agent pathogène. Une nouvelle méthode de classification a donc été développée.

La classification en **biovars** a été définie en se basant sur la capacité des isolats bactériens à utiliser et/ou oxyder trois hexose alcools: le mannitol, le sorbitol et le dulcitol et trois disaccharides : le lactose, le maltose et le cellobiose (Hayward, 1964). Six biovars ont donc été définis : 1, 2, 3, 4, 5 et 2T (Figure 6). Le même problème de représentativité de la variabilité de l'organisme a été rencontré.

2.2. La phylogénie actuelle : le schéma hiérarchique « phylotypes et séquévars »

A partir de 1992-1994, l'utilisation d'une nouvelle méthode d'analyse basée sur l'ADN, la RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) a permis d'identifier 38 génotypes multilocus séparables en deux divisions. La **division** I (Asiaticum) comprend les biovars 3, 4 et 5 et la division II (Americanum) regroupe les biovars 1, 2 et 2T. Ces travaux ont été complétés par l'analyse de séquences codant pour l'ARNr 16S et 23S, ils ont permis de mettre en évidence une autre division d'origine indonésienne (Taghavi *et al.*, 1996). Enfin, un quatrième groupe de souches africaines a été identifié par PCR, RFLP et analyse des régions *hrp* (Poussier, 2000).

La classification intraspécifique a ensuite été révisée sur la base des données d'analyse de quatre régions génomiques : ITS, *egl* (endoglucanase), *hrpB* et *mutS* ; quatre **phylotypes** ont été identifiés. Ils correspondent à des souches d'origine géographique différente (Figure 6) (Fegan and Prior, 2005). Ces phylotypes sont divisés en 51 **séquévars**, groupes rassemblant des souches dont les séquences *egl*/divergent à moins de 1% (Figure 6).

Le phylotype I rassemble des souches d'origine asiatique, le phylotype II d'origine américaine, le phylotype III d'origine africaine ; les souches du phylotype IV sont d'origine indonésienne. Le phylotype II comprend deux sous-groupes : le sous-cluster IIA regroupe les souches à large spectre et le IIB des souches spécialisées sur bananier (souches moko) et sur pomme de terre (souches « Brown Rot »). Ce dernier sous groupe inclue le séquévar 4 NPB (Non Pathogène sur Banane) regroupant des souches émergentes de gamme d'hôte très large, et virulentes même sur les tomates résistantes aux phylotypes I et II (Wicker *et al.*, 2007).

Le développement récent d'un schéma MLSA-MLST (Wicker *et al.*, 2010) a permis de réviser la classification en séquévars pour proposer une classification en **clades**.

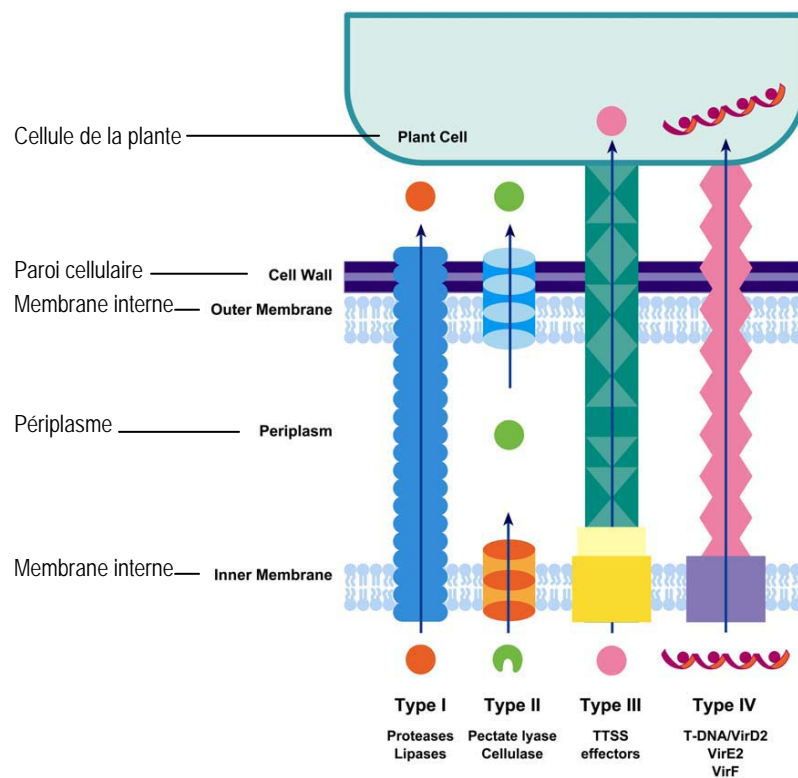


Figure 7 : Les différents systèmes de sécrétion (Ponciano *et al.*, 2003)

3. Les facteurs de virulence chez *Ralstonia solanacearum*

Deux concepts permettent d'appréhender le pouvoir pathogène (Andrison, 1995):

- la virulence traduit la capacité d'un agent pathogène à provoquer la maladie sur un hôte donné
- l'agressivité est une mesure de la quantité de symptômes induite par l'agent pathogène sur un hôte sensible

Les facteurs génétiques qui déterminent le pouvoir pathogène chez la bactérie peuvent être séparés en quatre groupes : les enzymes hydrolytiques, les effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III régi par les gènes *hrp*, les gènes régulateurs à effet pléiotrope et ceux impliqués dans la mobilité et le chimiotactisme de la bactérie.

3.1 Les systèmes de sécrétion

Il y a six types de systèmes de sécrétion des protéines dont les principaux chez les bactéries Gram négatives sont **les types I et II** qui sécrètent des protéines dans le surnageant ou dans les espaces intercellulaires de l'hôte alors que les **types III et IV** permettent d'introduire directement les protéines ou acides nucléiques dans les cellules hôtes (Ponciano *et al.*, 2003), (Figure 7).

Le système de sécrétion de **type II** permet la translocation de diverses exoprotéines à travers la membrane externe de nombreuses bactéries Gram négatives. Au moins 6 protéines majeures, dont les enzymes de dégradation des parois cellulaires, transitent via ce système. Le système de sécrétion de **type III** (T3SS) est codé par le cluster de gènes *hrp*. C'est une seringue moléculaire permettant d'injecter directement des protéines effectrices dans les cellules de la plante (Hueck, 1998).

Le fait que les effecteurs de type III (T3Es) partagent de nombreuses similarités avec les protéines végétales suggère que ces effecteurs agiraient directement comme agonistes ou antagonistes des composants cellulaires des plantes (Genin and Boucher, 2004). Le système de sécrétion de **type IV** est le seul système permettant de transférer à la fois des protéines et des acides nucléiques (Genin and Boucher, 2004).

3.2 Les exoenzymes

Elles sont transportées via le système de sécrétion de type II. Environ 10 exoprotéines sont détectables en cultures. Les enzymes pectine-méthylestérase, les polygalacturonases et l'endoglucanase (Egl) jouent un rôle déterminant dans le pouvoir pathogène bien qu'aucune d'entre elles ne soit à elle seule capable de causer la maladie (Schell, 1996). Les enzymes pectinolytiques (polygalacturonases) joueraient un rôle dans la nutrition de *R. solanacearum* (Tan Kersten *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces enzymes activeraient le mouvement de la bactérie dans les zones riches en pectines telles que la lamelle moyenne, et les sites d'émergence des racines secondaires. L'Egl semble jouer un rôle dans la vitesse et l'efficacité de la colonisation cellulaire.

3.3 Les exopolysaccharides

Les EPS sont uniquement produites par les souches virulentes de *R. solanacearum*. Elles s'accumulent dans les vaisseaux du xylème ce qui bloque la circulation de l'eau et des sels minéraux. Ces EPS permettraient également de faciliter la circulation de la bactérie dans la plante (Denny *et al.*, 1990).

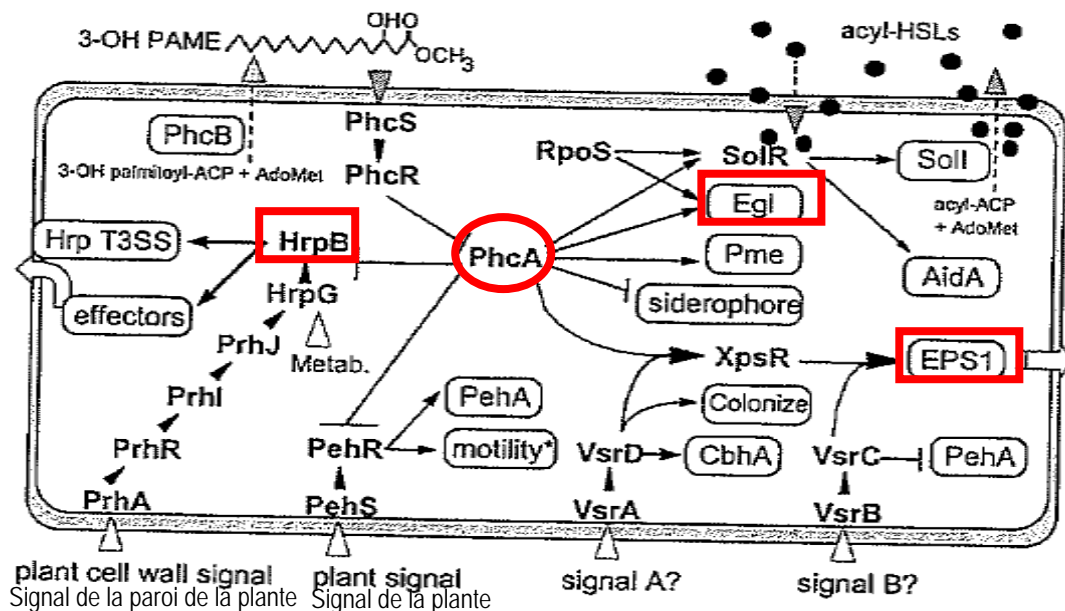


Figure 8: Modèle des réseaux de régulation chez *R. solanacearum* (Denny, 2006)

Acyl-HSLs = acyl-homosérine lactone

AidA = Protéine de fonction inconnue

Pme = Pectine méthyl estérase

Dans ce réseau, les quatre systèmes de régulation à deux composants sont PhcS-PhcR, PehS-PehR, VsrA-VsrD, VsrB-VsrC. Les autres régulateurs de transcription sont PhcA, SolR (qui répond aux acyl-HSLs), et PrhI, PrhJ et HrpG, HrpB dans la cascade de signaux Prh/Hrp.

Les protéines essentielles pour la biosynthèse de molécules signal extracellulaires sont phcB (methyltransferase S-adenosylmethionine dépendante).

3.4 Les gènes régulateurs à effet pléiotrope

Certains gènes régulateurs ont un effet pléiotrope : ils contrôlent plusieurs fonctions. Le gène *phcA* est l'un des plus importants car il contrôle la variation de phase chez *R. solanacearum*. En effet, l'activation du gène *phcA* donne un aspect muqueux et blanc-rosé aux colonies bactériennes cultivées sur milieu Kelman. Dans le cas contraire, les colonies ont un aspect rugueux et rouge (Poussier *et al.*, 2003) (Figure 4) et sont affectées dans leur pouvoir pathogène mais également pour la production d'EPS et d'Egl. En effet, *phcA* peut être inactivé par transposition d'éléments insertionnels. Il contrôle (i) la production d'EPS, (ii) la production d'Egl, (iii) la production de Pectine méthyl estérase (Pme), (iv) la compétence pour transformation naturelle, (v) un système de quorum-sensing à acyl-homosérine lactone (Denny, 2006) (Figure 8). *R. solanacearum* serait sous forme rugueuse au niveau du sol et, via une mutation réversible, elle prendrait sa forme virulente lors de l'infection d'une plante hôte (Denny *et al.*, 1994; Poussier *et al.*, 2003).

III. La lutte contre la bactérie

1. Les moyens de lutte disponibles : lutte réglementaire, lutte prophylactique, lutte culturale, lutte physique et chimique

1.1 La lutte réglementaire

R. solanacearum est un organisme de quarantaine de la liste A2 pour l'OEPP (Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes) et pour l'Union Européenne (UE), en particulier le phylotype II séquévar 1 et 2 qui cause la pourriture brune de la pomme de terre et le flétrissement bactérien de la tomate. La dissémination de cette maladie au sein de la région est empêchée essentiellement par des mesures internationales. Un système national de lutte réglementaire est recommandé pour tous les pays OEPP pour la détection, le confinement et l'éradication de cet organisme s'il est présent. Il fournit des garanties suffisantes pour permettre l'export des pommes de terre à l'intérieur de la région, en conformité avec la norme OEPP PM 2/58. Ce système est décrit dans la norme OEPP PM 9/3 (OEPP, 2003) et est équivalent à la Directive de lutte de l'UE (UE, 1998).

La lutte réglementaire instaurée par la norme OEPP PM 9/3 comporte plusieurs étapes :

- Détection :

Toutes les personnes qui suspectent ou qui confirment la présence de la maladie doivent le notifier à l'ONPV (Organisation Nationale de Protection des Végétaux). Des prospections systématiques doivent être menées, conçues en fonction de la biologie de l'organisme et des systèmes de production spécifiques de chaque pays concerné (sur la base d'une évaluation du risque). La détection de la présence de *R. solanacearum* nécessite des outils de diagnostic performants comme l'isolement sur milieu de culture semi sélectif, la sérologie (immunofluorescence ou test ELISA) et la biologie moléculaire (PCR).

- Détermination de la distribution :

Si un foyer est détecté par des tests de routine, ou si un foyer soupçonné est découvert, l'ONPV doit interdire tout mouvement du matériel directement concerné et de tout autre matériel suspect, et peut, si cela est adapté, prendre différentes mesures de sauvegarde comme l'interdiction de mouvements de plantes-hôtes à partir du lieu de production concerné. Le matériel suspect doit être soumis à des tests de confirmation dès que possible, en suivant la Norme OEPP PM 3/26 (OEPP, 1990).

- Prévention de la dispersion :

La plantation de tubercules ou de plants désignés comme "infestés" ou "probablement infestés" doit être interdite. Si *R. solanacearum* est détectée dans le système de production de pommes de terre de semence, les lots de propagation précédents doivent être testés. Les plants de tomates et d'autres hôtes destinés à la transplantation doivent faire l'objet d'inspections visuelles régulières.

- Elimination des systèmes de production :

Tous les plants désignés comme "infestés" doivent être détruits dans des conditions empêchant toute dissémination de la bactérie. Les possibilités pour la destruction sont notamment : la stérilisation par la chaleur, la transformation industrielle dans une usine qui possède des installations adéquates pour les déchets, la fermentation et le compostage dans des conditions recommandées par l'OEPP, l'incinération, l'enfouissement profond dans un endroit où il n'y a pas de risque d'écoulement vers des terres agricoles ou des eaux de surface.

1.2 La lutte prophylactique

La lutte prophylactique permet une réduction de potentiel d'inoculum et des voies de pénétration. Afin de limiter l'entrée de la bactérie dans la parcelle cultivée, il faut contrôler et éliminer autant que possible les hôtes alternatifs (adventices) sensibles ou « porteurs sains » (sans symptômes) car ils permettent à la bactérie de survivre et se multiplier en l'absence de la culture-hôte. Cette lutte consiste aussi en un drainage efficace, une désinfection des outils et des bottes mais elle implique aussi de travailler d'abord dans les zones saines, puis dans les zones infestées.

Dans les parcelles contaminées, outre les mesures réglementaires prévues, il est recommandé d'arracher les plants malades, de procéder à un assèchement. L'utilisation de plants certifiés ayant fait l'objet de contrôle au champ et en laboratoire reste la meilleure garantie (Wicker, 2004).

1.3 La lutte culturale

Une première stratégie consiste à raisonner les rotations en évitant les successions d'espèces hôtes. Par exemple, en Martinique, il est préconisé d'éviter les rotations cucurbitacées-solanacées, ces deux familles étant hôtes de *R. solanacearum* (Wicker *et al.*, 2009).

Une des voies les plus prometteuses consiste à utiliser des cultures assainissantes en rotation et/ou en association destinées à lutter contre *R. solanacearum*. Ces cultures doivent respecter plusieurs critères : il faut que les espèces soient non-hôtes et immunes, c'est à dire non colonisées et non infectées superficiellement sur les racines. Elles peuvent provoquer sur les bactéries un passage à la forme non-pathogène (rugueuse).

De nombreuses espèces sont utilisées, mais les études d'efficacité de l'assainissement sont parfois contradictoires. Le maïs est efficace pour diminuer l'incidence de maladie (Abd El-Ghafar, 1998) et les populations de pathogène (Melo *et al.*, 1999), mais il multiplie les bactéries dans sa rhizosphère. Le soja et le riz sont très efficaces pour diminuer la population de bactérie (Michel *et al.*, 1996), et induire l'apparition de formes rugueuses (Abd El-Ghafar, 1998); en revanche, la rhizosphère du soja peut héberger des populations de *R. solanacearum* pendant 33 semaines (Granada and Sequeira, 1983). C'est parmi les alliées que l'on trouve les espèces assainissantes les plus efficaces : l'oignon (*Allium cepa*), la cive (*Allium fistulosum*, *A. tuberosum*) et l'ail (*A. sativum*) sont reconnues pour leur caractère non-hôte, leur effet suppressif sur les populations bactériennes et leur effet suppressif sur l'incidence de la maladie (Yu, 1999).

1.4 Les lutttes physique et chimique

Ces lutttes sont rarement utilisées à cause du coût élevé des méthodes et de la dangerosité pour l'utilisateur et l'environnement. La solarisation consiste en une désinfection thermique du sol par recouvrement avec un film plastique transparent. Des traitements de fumigation peuvent aussi être utilisés mais de nombreux produits sont maintenant interdits. L'acide paracétique et le dioxyde de chlore peuvent aussi être utilisés pour désinfecter les eaux d'irrigation (Wicker, 2004).

1.5 La lutte biologique

Cette lutte consiste en général en l'utilisation de bactéries antagonistes ou de souches avirulentes de *R. solanacearum*. Différents microorganismes comme *Trichoderma sp.* ou *Bacillus sp.* peuvent être utilisés pour leurs propriétés d'inhibition de la croissance de *R. solanacearum*. Cependant elles ne sont pas forcément adaptées à la même niche écologique et n'ont pas la même capacité de colonisation de la rhizosphère. Les mutants avirulents de *R. solanacearum* présentent ces caractéristiques et peuvent donc induire des phénomènes de résistance chez la plante, cependant ils sont en général moins compétitifs que les souches virulentes (Poussier, 2000).

2. La lutte génétique : sélection et utilisation de variétés résistantes

2.1 La résistance variétale des Solanacées à *R.solanacearum*

L'utilisation de cultivars résistants est la méthode de lutte qui est potentiellement la plus efficace contre le flétrissement bactérien. Depuis des décennies, les sélectionneurs ont identifié et utilisé des sources de résistance (croisements, hybrides) intra ou interspécifiques pour créer des cultivars de tomate aubergine et piment résistants au flétrissement bactérien. Cependant, la recherche de variétés résistantes est rendue difficile par l'existence de fortes interactions génotype-milieu. Celles-ci sont causées par la forte variabilité de l'agent pathogène d'une part et par l'influence des conditions environnementales sur l'expression de la résistance d'autre part. Surmonter les problèmes de variation de l'expression de la résistance est donc un nouveau challenge rendu indispensable par le commerce international de cultivars résistants. L'instabilité de la résistance peut être expliquée par (Lebeau *et al.*, 2010):

- les connaissances insuffisantes des mécanismes impliqués dans les différents phénotypes de résistance (résistance totale, infections latentes). En effet, une plante pouvant être colonisée par *R. solanacearum* sans développer de symptômes peut être responsable de la multiplication et de la dispersion de la bactérie.
- les connaissances insuffisantes des caractéristiques génétiques des souches utilisées dans les programmes de sélection variétale.
- les interactions méconnues entre les facteurs génétiques impliqués dans la résistance de l'hôte et la pathogénicité de la bactérie.

La résistance au flétrissement bactérien chez la tomate est de type polygénique; plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci) ont été localisés sur différents chromosomes de la tomate. Chez Hawaii 7996, le QTL majeur se trouve sur le chromosome 6, tandis que d'autres se trouvent sur les chromosomes 3, 4 et 12 (Carmeille *et al.*, 2006).

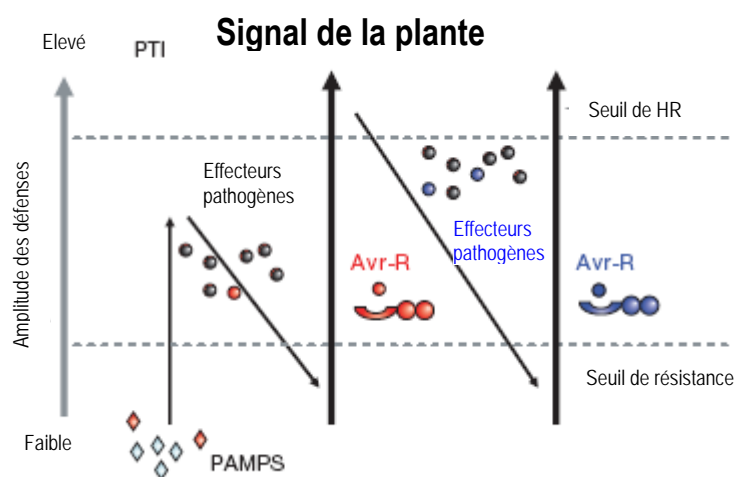


Figure 9 : Le modèle en zig-zag : illustration de l'efficacité du système immunitaire des plantes
(Jones and Dangl, 2006)

2.2 La durabilité de résistance chez les plantes hôtes et le potentiel évolutif de l'agent pathogène

i. Les interactions plante-microorganisme

Beaucoup de protéines de résistance (PR) seraient activées indirectement par des effecteurs et non par reconnaissance directe. Les PR reconnaissent indirectement les effecteurs pathogènes en maintenant l'intégrité des cibles des cellules hôtes.

Le système immunitaire de la plante est divisé en deux voies : l'une, extracellulaire, implique les récepteurs de reconnaissance de l'agent pathogène (PRRs, Pathogen Recognition Receptors) qui ciblent des motifs moléculaires microbiens à évolution lente ou des motifs moléculaires associés au pathogène (PAMPs) ; l'autre agit dans la cellule via les protéines polymorphes NB-LRR (nucleotide binding – leucine rich repeat) codées par les gènes R. L'évolution du système immunitaire de la plante peut être représenté par un modèle en zig-zag constitué de quatre phases (Figure 9) (Jones and Dangl, 2006):

- Phase 1 : les PAMPs sont reconnus par les PRRs, ce qui conduit à une PTI (immunité déclenchée par les PAMPs) pouvant stopper la colonisation et le processus infectieux.
- Phase 2 : les agents pathogènes plus virulents libèrent des effecteurs interférant avec la PTI, menant à la sensibilité déclenchée par effecteur : l'ETS (Effector-triggered susceptibility).
- Phase 3 : un effecteur donné est spécifiquement repéré directement ou indirectement par une des protéines NB-LRR, et provoquer l'immunité ciblant les effecteurs : l'ETI (Effector-triggered immunity). L'ETI résulte en une résistance à la maladie et entraîne généralement une réaction d'hypersensibilité (HR) au niveau du site d'infection ainsi qu'une activation des réactions de défense.
- Phase 4 : la sélection naturelle conduit les agents pathogènes à éviter l'ETI en éliminant ou diversifiant l'effecteur reconnu, ce qui aboutit à un nouveau phénomène d'ETS.

Il y a une course de coévolution entre plantes et agents pathogènes qui génère des répertoires larges et polymorphes d'effecteurs et de protéines R. Ces répertoires sont collectivement essentiels, mais individuellement non indispensables du fait de la duplication des gènes de résistance et de la redondance fonctionnelle d'effecteurs. La résistance liée à un gène R est souvent surmontée après quelques années d'usage agricole. L'identification systématique des groupes d'effecteurs redondants peut potentiellement révéler des processus contribuant aux défenses antimicrobiennes et donnant des clés pour les protéines cibles des plantes et/ou impliquées dans la reconnaissance des effecteurs (Collmer *et al.*, 2009).

ii. Les facteurs d'évolution des gènes de l'agent pathogène et de la plante hôte

Les quatre forces d'évolution et le risque lié à l'évolution des agents pathogènes sont (McDonald and Linde, 2002):

- La mutation : processus créant de nouvelles lignées d'agents pathogènes virulents surmontant les gènes de résistance. Les mutations créent aussi des lignées à pathogénicité élevée qui contournent la résistance quantitative des plantes. Une mutation dans un gène d'avirulence codant pour l'éliciteur reconnu par un gène de résistance est requise pour créer une lignée virulente. Les taux de mutations sont généralement faibles, mais différent selon les loci et les agents pathogènes.
- La taille de la population et la dérive génétique : la taille de la population influence le nombre de mutants. Dans de petites populations, la dérive génétique entraîne une perte d'allèles au cours du temps.
- Le flux de gènes et de génotypes : processus dans lequel des allèles ou individus sont échangés entre des zones distinctes géographiquement. Ce processus déplace les allèles mutants virulents dans différentes populations. Les populations à flux de gènes élevés ont une diversité génétique plus élevée que celles à flux faibles.

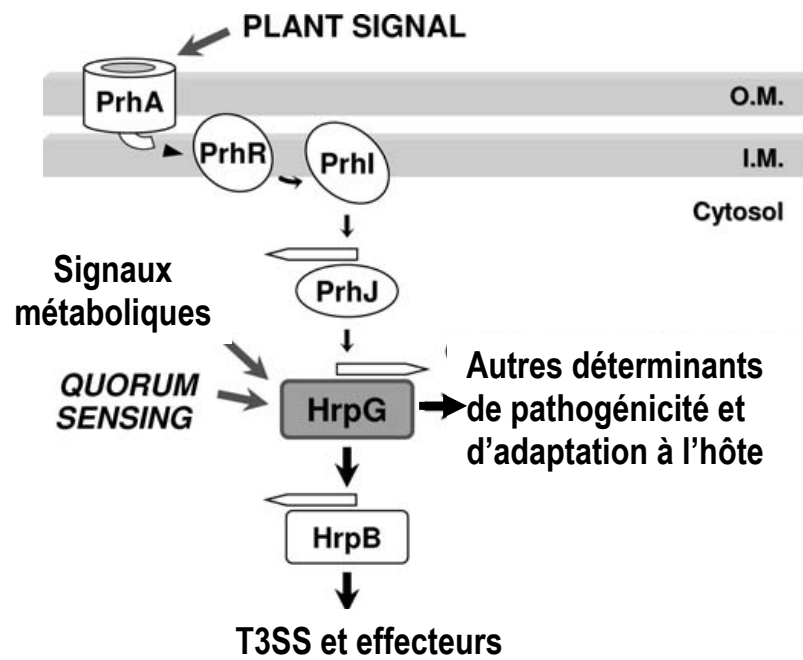


Figure 10 : Modèle simplifié de la cascade de régulation Hrp chez *R. solanacearum* (Valls *et al.*, 2006)

- La sélection imposée par un gène de résistance majeure et la résistance quantitative : principale force qui entraîne des changements dans la fréquence des allèles mutants. La sélection dirigée survient lorsqu'un gène de résistance majeur est largement distribué dans une grande zone géographique. L'alternative la plus commune est de réaliser une pyramide de gènes de résistance au sein du même cultivar pour que l'agent pathogène ne puisse pas réaliser une série de mutations correspondant à chacun des gènes de résistance. Ou bien il faut réaliser des cultures associées de cultivars ayant différents gènes de résistance. Les populations d'agents pathogènes soumis à des sélections dirigées sur plusieurs générations évoluent plus rapidement que les autres populations.

Les gènes codant pour les effecteurs évoluent à des vitesses élevées, comparé au génome-cœur. Les gènes codant pour les protéines effectrices sont des cibles directes des forces de l'évolution qui conduisent la coévolution entre l'hôte et le pathogène. Les effecteurs cibles évoluent pour contourner la manipulation par les effecteurs pathogènes. L'identification d'allèles des cibles insensibles à la manipulation par les effecteurs de l'agent pathogène mais qui gardent leur fonction intrinsèque est une stratégie alternative à l'usage de gènes R classiques pour la production de plants résistants (Hogenhout *et al.*, 2009).

La résistance gène pour gène gouvernée par les gènes R est fréquemment rendue inefficace par la mutation ou la perte de la fonction d'un gène d'avirulence. Les gènes d'avirulence mutant facilement dans les populations pathogènes sont moins critiques pour la fitness du pathogène que les gènes mutant rarement. La sélection d'un gène R reconnaissant ces gènes d'avirulence critiques serait plus durable, car la mutation nécessaire pour contourner ce gène engendrera une perte de compétitivité chez l'agent pathogène : fitness cost (Ponciano *et al.*, 2003).

IV. Les effecteurs de type 3 expliquent-ils les phénotypes de virulence ou d'avirulence sur plants ?

1. Présentation des effecteurs de type 3 (T3Es)

1.1 La régulation de la sécrétion des T3Es et du T3SS

Les gènes codant pour les T3SS sont appelés *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) chez les bactéries phytopathogènes (Galan and Collmer, 1999). Les gènes *hrp* sont généralement organisés en clusters et localisés dans des îlots de pathogénicité qui sont des régions distinctes variant en contenu en bases C+G et bordés par des séquences d'insertion, des gènes de bactériophages et des éléments transposables. Les gènes *hrp* codent pour des protéines qui régulent la synthèse ou l'assemblage du T3SS (composants structuraux ou protéines extracellulaires sécrétées par le T3SS).

Ce système de sécrétion a été décrit chez la plupart des bactéries phytopathogènes (principalement *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* spp., *R. solanacearum*) mais aussi des agents pathogènes animaux et humains (*Shigella* spp., *Yersinia pestis*).

Chez *R. solanacearum*, les T3Es sont caractérisés par un biais de composition sur les 50 premiers acides aminés : (i) surreprésentation de sérine et proline, (ii) sous-représentation de leucine (Cunnac *et al.*, 2004). Chez *P. syringae*, c'est aussi dans les 50 premiers acides aminés que se trouve le profil spécifique des effecteurs (Arnold *et al.*, 2009).

Le gène *hrpG* contrôle l'expression du cluster *hrp* codant pour le T3SS, mais aussi de voies indépendantes du T3SS. Ces voies incluent d'autres déterminants de virulence et des gènes impliqués dans l'adaptation à la vie dans l'hôte. Le gène *hrpB* régule spécifiquement la synthèse du T3SS et d'un certain nombre d'effecteurs comme PopA, PopB, PopC (Valls *et al.*, 2006) (Figure 10).

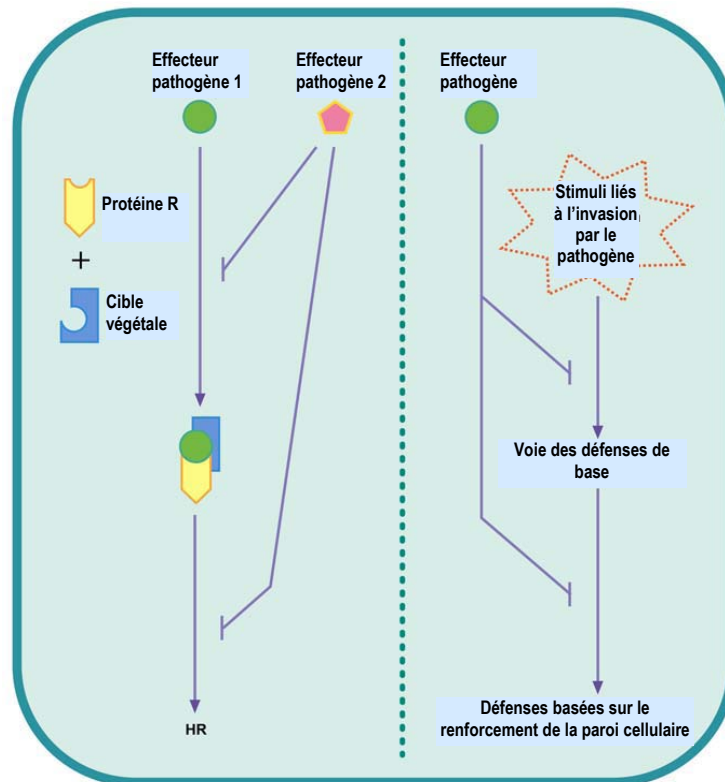


Figure 11 : Interactions entre les effecteurs de type 3 et les protéines R de la plante (Ponciano *et al.*, 2003)

Tableau 1 : Variations dans la distribution des gènes codant pour des effecteurs de type 3 chez 5 souches appartenant au phylotype 3 (Guidot *et al.*, 2007).

GMI1000 effector gene ^a	Gene family ^b	Distribution ^c				
		NCPBP3059 (eggplant, Burkina Faso)	JTS25 (<i>Pelargonium asperum</i> , Reunion Island)	NCPBP283 (<i>Solanum pavidum</i> forme, Zimbabwe)	CFBP6941 (tomato, Cameroon)	CFBP6942 (pepper, Cameroon)
RSc0245	RipB/HopPtoQ	+	+	-	+	+
RSc0257		-	+	+	+	+
RSc0321		+	-	-	-	-
RSc0826	PopP	+	+	+	-	+
RSc0895		+	-	+	-	-
RSc1349	SspH1	+	-	-	-	+
RSc1356	GALA	+	-	-	-	-
RSc1386	HLK	+	-	-	-	-
RSc1801	GALA	+	-	+	-	-
RSc1815	AvrBs3	+	-	-	+	-
RSc1839	SKWP	+	+	-	+	+
RSc2101		+	-	-	-	+
RSc2132	PopP	+	-	-	-	-
RSc2359		+	-	-	-	-
RSc2775	PopW	-	+	+	+	+
RSc3174		+	-	-	-	-
RSc3212	RipT/YopT	-	+	-	-	-
RSc3290	HopPtoH	+	-	-	-	-
RSc3369	AvrPphE	-	+	+	+	-
RSp0028	GALA	+	+	+	-	+
RSp0160	HLK	+	-	-	+	-
RSp0216	S/T kinase	+	+	+	+	-
RSp0218		+	+	+	-	-
RSp0296	SKWP	+	-	-	-	-
RSp0304	AvrPphD	+	-	-	-	-
RSp0572	HopPtoH	-	+	+	-	+
RSp0822	AvrPphF	-	-	-	+	-
RSp0875	PopC	+	+	+	-	-
RSp0876	PopB	+	-	-	+	+
RSp0879		+	-	-	+	+
RSp0885		+	-	-	+	+
RSp1239		+	-	-	-	-
RSp1384		+	+	-	+	-
RSp1582		+	+	-	-	+
RSp1601		+	+	-	-	-

1.2 Les différents types d'effecteurs de type 3 et leur rôle dans la pathogénicité

Les effecteurs peuvent être considérés comme des « gènes parasites ayant une expression phénotypique dans leur hôte et sur leur comportement » (Ponciano *et al.*, 2003). Les effecteurs ont souvent plus d'une cible hôte. Chaque interaction entre un effecteur et une protéine hôte peut être bénéfique pour l'agent pathogène, avoir des conséquences négatives, ou avoir un effet neutre.

Les mécanismes d'action des effecteurs ne sont pas encore très clairs, mais ils ont certains effets comme (Ponciano *et al.*, 2003; Hogenhout *et al.*, 2009) :

- La stimulation d'une augmentation du pH et du contenu nutritif de l'apoplasme de la plante, ce qui rend les flux apoplasmiques plus propices à la multiplication bactérienne.
- L'activation des réponses de défense de l'hôte suite à la reconnaissance par une protéine R (Figure 11). Cette activation se caractérise par de nombreux événements cellulaires et moléculaires comme la formation de formes actives de l'oxygène, l'induction de gènes de défense et, dans de nombreux cas, l'induction d'une mort cellulaire rapide, appelée réaction d'hypersensibilité.
- L'inhibition de l'activation des réactions de défense de l'hôte induites par d'autres effecteurs d'avirulence (Figure 11).
- L'inhibition des mécanismes de défense de base de l'hôte (Figure 11).
- Le mimétisme moléculaire : beaucoup d'effecteurs produisent des analogues d'hormones des plantes.

Parmi les différents enseignements apportés par la recherche sur les T3SS, certains points sont à relever (Ponciano *et al.*, 2003):

- Dans certains cas les effecteurs contrôlent la multiplication intercellulaire alors que dans d'autres cas, les effecteurs contrôlent la capacité de la bactérie à sortir des espaces intercellulaires hors de la surface de la feuille.
- Les effecteurs ne contribuent pas tous à la pathogénicité et ceux qui y contribuent auraient des contributions quantitativement différentes.
- La redondance des fonctions pourrait rendre difficile la mesure de la fonction de pathogénicité liée à un gène.
- Le rôle d'un gène d'effecteur particulier peut varier pour différentes origines génétiques des bactéries.

2. Etat des connaissances sur la distribution des T3E chez *Ralstonia solanacearum*

2.1 Informations sur la répartition et la diversité des effecteurs de type 3

Actuellement, 94 effecteurs de type III distribués dans les différentes souches de *R. solanacearum* ont été répertoriés (Poueymiro and Genin, 2009).

Une étude menée par Guidot *et al.* (2007) a permis de montrer que des variations dans la distribution des déterminants de pathogénicité connus ou hypothétiques sont observées pour deux classes de gènes : ceux qui codent pour des protéines liées à l'hémagglutinine et ceux qui codent pour des T3Es. Ceci montrerait l'adaptabilité de la bactérie aux modifications de son environnement. Il existe des variations importantes en contenu des gènes codant pour les T3Es ou des divergences de séquences entre des souches proches appartenant au même phylotype. Dans l'étude réalisée, 35 gènes sur 80 ont une distribution variable sur uniquement 5 souches liées taxonomiquement et originaires de la même région (Tableau 1). Neuf de ces 35 gènes appartiennent à des régions à usage de codon alternatif (ACURs), potentiellement acquises par transferts génétiques horizontaux (Guidot *et al.*, 2007). Ces transferts de gènes de virulence peuvent survenir entre souches appartenant à des phylotypes différents (Guidot *et al.*, 2009; Wroblewski *et al.*, 2009).

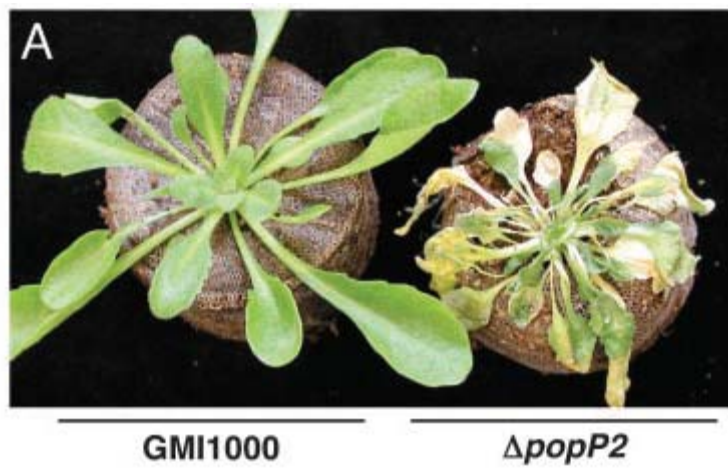


Figure 12 : Effet de la mutation du gène *popP2* sur le phénotype sur *Arabidopsis thaliana*
(Deslandes *et al.*, 2003)

Des analyses phylogénétiques basées sur la répartition de tous les T3Es connus ou putatifs ont établi des arbres significativement différents des arbres basés sur les gènes conservés comme *mutS* et *egl*. Ceci suggère que les gènes de virulence ont évolué (ajout, suppression, modification) différemment de l'ensemble des gènes présents chez *R. solanacearum*. Les T3Es sont une source importante de variabilité de la gamme d'hôtes (Remenant *et al.*, 2010).

La compréhension de la répartition des effecteurs permet de mieux comprendre les mécanismes d'évolution de ces gènes. Une analyse des gènes *popP* montre que les variations alléliques des gènes *popP* sont assez limitées chez *R. solanacearum* et qu'elles auraient peu d'effets sur les fonctions des protéines correspondantes. Cependant, il existe une variabilité importante concernant la présence ou absence et le nombre de copies de chaque gène dans chaque souche. Il y aurait également une forte corrélation entre la distribution des gènes *popP* et la position phylogénétique des souches. Ces informations infirment des scénarios d'évolution proposés jusque là et mettent en évidence la complexité des mécanismes évolutifs (Lavie *et al.*, 2004).

2.2 Informations sur la fonction des effecteurs de type 3

La répartition et la fonction des T3Es présents chez *R. solanacearum* sont très diversifiées. Seuls les principaux effecteurs étudiés seront présentés dans ce paragraphe.

Une des familles de gènes les plus étudiées est la famille GALA qui illustre parfaitement la synergie et le chevauchement des fonctions des T3Es. Seule la mutation des sept gènes *gala* affecte la virulence de la souche GM1000 sur *Arabidopsis thaliana*. De plus, l'étude de cette famille a permis de montrer que la contribution individuelle d'un T3E varie selon l'hôte. Le gène *gala7* est un exemple typique car il est indispensable pour la virulence de GM1000 sur *Medicago trunculata* mais pas sur d'autres hôtes (Poueymiro and Genin, 2009).

Deslandes *et al.* (2003) se sont intéressés aux interactions entre une protéine de résistance d'*Arabidopsis thaliana* (RRS1-R) et la protéine d'avirulence PopP2. RRS1-R confère un large spectre de résistance à *R. solanacearum* via son interaction avec le T3E PopP2 et le facteur RD19 (Figure 12). Cette interaction a lieu dans le noyau des cellules de la plante hôte. PopP2 est donc une protéine d'avirulence directement adressée dans le noyau des cellules de l'hôte.

Liu *et al.* (2009) se sont penchés sur la fonction des gènes *avrA* et *popP1*. Ces deux T3Es limitent la gamme d'hôtes de la souche GM1000 car ils élicitent une HR. Seule la double inactivation des gènes a permis à GM1000 d'entraîner un flétrissement des plants de tabac. De part sa fonction dans l'activation de la résistance, *avrA* semble être la cible d'insertions qui permettraient à *R. solanacearum* d'échapper à la reconnaissance et donc aux réponses de défense de l'hôte. Cette étude a également montré que ces deux effecteurs agissent à différentes phases du cycle infectieux.

Récemment, une nouvelle harpine appelée PopW a été identifiée (Li *et al.*, 2010). Les harpines sont des protéines riches en glycine qui élicitent la réaction d'hypersensibilité. Cette protéine a été localisée dans les parois pectocellulosiques, ce qui indiquerait une action de modification des propriétés de la paroi végétale. De plus, elle est synthétisée via le système *hrpB* et est conservée chez une large gamme de souches de *R. solanacearum*.

Tableau 2 : Distribution des gènes candidats étudiés et association de ces gènes à des phénotypes

Effecteur putatif	Description	Phyl IIB	phylotype I	Phylotype IIB		Phylotype IIA	Phylotype III	Phylotype IV	Phénotype	Présence sur sonde
		UW551	GMI1000	IPO1609	MolK2	CFBP2957	CMR15	PSI07		
PTO1391	AWR6 AvrPtoB family HopH1 family	RRSL_00546		RALIP_1563	RALMO_2489				Virulence E1, E6, T5	3/3
BA02498					RALMO_2447				Virulence E1	3/3
RSp0572			RSp0572						avirulence T5	3/3
RSc0868			RSc0868				CMR15v4_20019		avirulence E6	3/3
PTO7001	PopP2			RALIP_4839	RALMO_1729				Virulence E1, E6, T5	2/3
PTO4834		RRSL_03923		RALIP_0863	RALMO_5162	RCFBPv3_mp10565	CMR15v4_mp10526	RPSI07v3_30809	Virulence E1	2/3
RSc0826			RSc0826						avirulence E6	2/3
RSc1723			RSc1723						avirulence E6	2/3
RSp0028	GALA3		RSp0028			RCFBPv3_mp10032	CMR15v4_mp10028	RPSI07v3_mp10038	avirulence E6	2/3
RSp1384			RSp1384	RALIP_4540	RALMO_0377	RCFBPv3_mp30150	CMR15v4_mp30042	RPSI07v3_mp11380	avirulence E6	2/3
RSp1460			RSp1460		RALMO_1231	RCFBPv3_mp30206	CMR15v4_mp30120	RPSI07v3_mp11436	avirulence E6	2/3
RSp1582			RSp1582			RCFBPv3_mp30467	CMR15v4_mp20662	RPSI07v3_mp11696	avirulence E6	2/3
PTO1326	SspHI family	RRSL_0703			RALMO_2425 +RALMO_2423+ RALMO_2424				virulence T5	1/3
PTO3560				RALIP_1493		RCFBPv3_11872		RPSI07v3_30208	virulence T5	1/3
PTO3558		RRSL_04659		RALMO_0243	RALIP_3747	RCFBPv3_mp30036			Virulence E1, E6, T5	1/3
PTO1808		RRSL_01266		RALIP_3273	RALMO_4221				Virulence E1, E6, T5	1/3
PTO1265	BA7003	RRSL_04505		RALIP_0702					Virulence E1, E6, T5	1/3
BA7003				RALIP_4651	RALMO_1755				Virulence E1	1/3
RSc1800			RSc1800			RCFBPv3_11806	CMR15v4_11805	RPSI07v3_30153	avirulence E1, virulence T5	1/3
RSc1801			Rsc1801			RCFBPv3_11807	CMR15v4_11806	RPSI07v3_30154	avirulence E1	1/3
RSc2775	popW	RRSL_02682	Rsc2775	RALIP_1816	RALMO_0904	RCFBPv3_10686	CMR15v4_10642	RPSI07v3_20278	avirulence E1	1/3
RSp0099	AWR2, RipA	RRSL_03418	RSp0099	RALIP_4984&83	RALMO_4617	RCFBPv3_mp10070	CMR15v4_mp10070	RPSI07v3_mp10069	avirulence E1	1/3
RSp0296	SKWP5		RSp0296		RALMO_2016	RCFBPv3_20594 +20596	CMR15v4_mp10270	RPSI07v3_30841	avirulence E1	1/3
RSp0847	AWR4		RSp0847	RALIP_4139	RALMO_1450	RCFBPv3_mp20291	CMR15v4_mp10826	RPSI07v4_mp0792	avirulence E1	1/3
RSp0854	hrpZ	RRSL_00507	RSp0854			RCFBPv3_mp20298	CMR15v4_mp10833	RPSI07v4_mp0800	avirulence E1	1/3
RSp1130			RSp1130			RCFBPv3_mp20625	CMR15v4_mp20236	RPSI07v3_mp11176	avirulence E1	1/3

gène
conservé
(Id≥80%)
ID < 80%
Fragment

3. Avancées des recherches sur la détermination du phénotype de virulence par les T3E chez d'autres organismes

Les T3Es sont essentiels pour la virulence de différentes bactéries comme *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* et *Erwinia* spp.. Les agents pathogènes de plantes possèdent différentes collections de T3Es qui partagent des fonctions similaires, notamment l'inhibition des défenses de l'hôte (Grandt *et al.*, 2006).

L'étude du répertoire d'effecteur de *Pseudomonas syringae* a permis de révéler que la plupart des effecteurs de cette bactérie agissent en ciblant la membrane plasmique, les chloroplastes et les mitochondries des cellules hôtes. De plus, le sécrétome de cette bactérie varie de façon importante, ce qui lui permet de s'adapter à différents hôtes (Greenberg and Vinatzer, 2003).

Enfin, une étude très proche de celle réalisée pour ce mémoire propose des explications de la spécificité d'hôte de *Xanthomonas*. Deux hypothèses sont retenues :

- 1- elle s'explique par la position phylogénétique des souches
- 2- elle s'explique par l'association de gènes de virulence permettant une convergence « pathologique » des souches phylogénétiquement distinctes.

Les résultats de cette étude montrent une correspondance entre la composition des répertoires de T3Es et les pathovars de *Xanthomonas*. Pour les pathovars polyphylétiques, les gènes codant pour les T3Es expliqueraient la convergence pathologique de différentes souches phylogénétiquement distantes. De plus, des réarrangements d'ADN au sein des gènes codant pour les T3Es seraient en corrélation avec la spécificité d'hôtes (Hajri *et al.*, 2009).

V. Le contexte et la problématique du stage

1. Le contexte, démarche initiale

Un programme de recherche est actuellement en cours au sein du Pôle de Protection des Plantes du Cirad et porte sur la résistance des Solanacées à graines (tomate, aubergine, piment) au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*. L'inoculation de 30 accessions de tomate, aubergine, piment par une core-collection mondiale de *Ralstonia solanacearum*, a permis d'identifier 6 groupes de souches de virulences proches, appelés pathoprofiles (Lebeau *et al.*, 2010), ainsi qu'un certain nombre de modèles d'interaction souche x cultivar très tranchés, allant de l'incompatibilité totale (résistance de haut niveau) à la compatibilité léthale (sensibilité). La mise en relation de ces phénotypes avec des données d'hybridation génomique comparative (CGH) générées sur une puce 7K pangénomique rassemblant 7000 gènes communs et spécifiques dans le complexe d'espèces (Guidot *et al.*, 2009), a permis d'identifier des répertoires de gènes bactériens spécifiquement associés à la virulence ou avirulence sur certains cultivars. Ces gènes codent pour des effecteurs de type III, particulièrement nombreux chez *R. solanacearum* (94 identifiés à ce jour) (Poueymiro and Genin, 2009).

La combinaison des données de ces études a servi de base au travail présenté dans ce mémoire. La confrontation entre répertoires d'effecteurs et phénotypes de virulence ou avirulence sur deux lignées résistantes d'aubergine et une lignée résistante de tomate a permis d'identifier une liste de 26 effecteurs candidats (gènes présentant de fortes homologues de séquence avec des gènes connus et dont on suppose une fonction similaire). La distribution de ces 26 T3Es dans les sept génomes séquencés actuellement est présentée dans le tableau 2 (Remenant *et al.*, 2010). La présence de chaque effecteur candidat dans une souche est indiquée par un code spécifique de la souche (en vert), la présence d'un fragment de ce gène est indiquée en orange.

2. La problématique et les objectifs

La question de recherche qui découle de ces études est la suivante : **Y a-t-il une corrélation entre le contenu en effecteurs de type III d'une souche** (présence/absence, polymorphisme de taille/séquence) **et sa virulence sur tomate et aubergine?**

L'objectif de cette étude est donc de valider la corrélation entre contenu en effecteurs bactériens et propriétés de virulence ou avirulence sur 2 cultivars d'aubergine (E6, E1) et un cultivar de tomate (T5), dont les résistances ont été ou sont en cours de cartographie. Une collection de 48 souches bactériennes (dont des références virulentes et avirulentes) sera utilisée pour une inoculation en conditions contrôlées sur aubergine résistante (E6, E1) et sensible (E8), tomate résistante (T5) et sensible (T10), afin d'observer les différents types d'interaction (avirulence, colonisation sans symptôme, flétrissement de la plante). Parallèlement, les effecteurs de type III putativement associés à la virulence (onze) et à l'avirulence (une quinzaine), seront amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans chaque souche. Le contenu en effecteurs de chaque souche sera ensuite mis en regard de son profil de virulence.

Cette étude permettra donc :

- de comprendre la répartition (conservation, variation) des effecteurs dans une large collection de souches
 - d'établir un lien entre la répartition d'effecteurs et le phylotype des souches
 - de valider ou d'infirmer des hypothèses quant à l'implication de certains effecteurs dans le pouvoir pathogène de différentes souches de *R. solanacearum* :
 - pas d'effet majeur expliqué par des effecteurs
 - implication d'un seul effecteur
 - implication d'une combinaison d'effecteurs
- si la présence de certains effecteurs semble expliquer la pathogénicité des souches :
- les effecteurs impliqués sont-ils les mêmes quel que soit le cultivar ?
 - Y-a-t-il une spécificité d'implication des effecteurs par cultivar ?

B. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 3 : Liste des souches de la core –RS2

n° RUN	Code international	Hôte d'origine	Pays/Région	Année	Phylotype	Sequevar
16	CFBP6784	<i>Anthurium andreanum</i>	Martinique	1999	IIB	4NPB
17	CFBP6783	<i>Heliconia rostrata</i>	Martinique	2002	IIB	4NPB
18	ANT80	<i>Anthurium andreanum</i>	Martinique	2002	IIB	4NPB
36	CFBP2957	<i>Solanum lycopersicum</i> a	Martinique	1987	IIA	36
39	CFBP3059	<i>Solanum melongena</i> b	Burkina Faso	1990	IIIB	48
54	GMI1000	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane française	NA	I	18
133	CFBP6941	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	2005	IIIA	29
145	CFBP6942	<i>Vaccinium membranaceum</i> c	Cameroun	2005	IIIA	29
147	CFBP7029	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	2005	IIB	1
150	CFBP7032	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	2005	IIA	1
155	PSS366	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	2003	I	15
157	PSS004	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	1988	I	15
215	CFBP7058	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Cameroun	2005	I	13

Tableau 4 : Liste des souches réunionnaises

n° RUN	Code international	Hôte d'origine	Phylotype	Sequevar	Année
58	JQ1143	<i>Solanum tuberosum</i> d	IIA	39	
59	JT510	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	
60	JT525	<i>Pelargonium</i>	IIIC	19	1993
61	JT528	<i>Solanum tuberosum</i>	IIIC	19	1999
77	NCPBP1029	<i>Pelargonium</i>	IIIC	NA	1961
160	JT516	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
471	JT519	<i>Pelargonium</i>	I	31	1993
476	JS529	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1997
523	CFBP4963	<i>Solanum tuberosum</i>	III	19	
608	JT523	<i>Solanum tuberosum</i>	I	31	
623	CFBP4801	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1988
654	2004 181	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	2004
657	CFBP2146	<i>Pelargonium</i>	III	19	1980
681	JT511	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
693	CFBP4964	<i>Pelargonium</i>	III	19	1994
697	JT514	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
843	JQ1006	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
845	JQ1073	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1993
848	JQ1023	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1993
880	JQ1078	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	
889	JQ1107	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
913	JQ1092	<i>Solanum tuberosum</i>	III		1989
919	JQ1006	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
921	JQ1007	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
923	JQ1009	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
924	JQ1017	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1993
925	JQ1018	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1992
926	JQ1019	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	
928	JQ1023	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1993
930	JQ1044	<i>Pelargonium</i>	I	NA	1993
931	JQ1051	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1993
934	JQ1078	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	
936	JQ1101	<i>Solanum lycopersicum</i>	IIB	1	1993
941	JQ1131	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1992
944	CFBP2148	<i>Solanum tuberosum</i>	IIB	1	1982

a= tomate, b=aubergine, c=airelle, d= pomme de terre

I. Les souches bactériennes

Pour cette étude, deux collections de souches de *R. solanacearum* ont été utilisées.

1. La collection de souches de la core-RS2

La collection mondiale Core-RS2 a été assemblée durant la thèse d'Aurore Lebeau (Lebeau *et al.*, 2010) suite à l'inoculation de cultivars sensibles de tomate, aubergine et piment. Elle contient des souches réparties dans tout l'arbre phylogénétique et appartenant à 3 des 4 phylotypes (Tableau 3). A ces souches s'ajoutent deux souches émergentes : RUN 16 et RUN 18 (Wicker *et al.*, 2007).

2. La collection de souches réunionnaises

La collection réunionnaise est composée de 35 souches appartenant aux phylotypes I, IIA, IIB et III, prélevées sur différents sites et différents hôtes de la Réunion (Tableau 4).

3. L'isolement des souches et l'extraction d'ADN

Les souches sont conservées à -80°C sur des billes microporeuses (Tubes Cryobank®). Sous hotte à flux laminaire, une bille est prélevée à l'aide d'une aiguille et placée dans un bouillon nutritif (Annexe I). Après 24h d'incubation à 28°C en agitation, 50µL sont prélevés et étalés sur du milieu Kelman (Annexe I) en boîte de Pétri selon la technique des « trois secteurs ». Après deux jours, des colonies isolées sont prélevées et étalées sur milieu Kelman. Après une croissance de 24 à 48h, les souches sont prélevées et mises en suspension. Deux types de suspensions sont préparés : les suspensions à environ 10⁸ CFU.mL⁻¹ (1 anse d'environ 1µL dans 1mL d'eau stérile) pour une utilisation directe en PCR et les suspensions concentrées (1 anse de 10µL dans 1mL d'eau) pour l'extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN est réalisée sur les suspensions concentrées à l'aide d'un kit Qiagen DNeasy® Tissue selon le protocole en annexe II. La quantification d'ADN est ensuite réalisée par spectrophotométrie au Nanodrop.

II. Le matériel végétal

Dans cette étude, les deux espèces considérées sont la tomate et l'aubergine. Les accessions choisies appartiennent à une collection appelée core-TEP, définie par Lebeau *et al.*, 2010.

1. Aubergine (*Solanum melongena*): les accessions sensibles et résistantes

Dans cette collection, deux cultivars d'aubergines résistants (E1 : Accession MM853, E6 : MM960) et un sensible (E8 : MM738) ont été choisis (Tableau 5). MM853 est un cultivar provenant d'Asie et multiplié par l'INRA ; il accumule des résistances provenant de différentes sources. MM960 a été créé à l'INRA de Guadeloupe à partir d'un croisement entre une lignée résistante provenant de Turquie et de l'espèce apparentée sauvage *Solanum aethiopicum*. E1 a été choisie pour sa résistance à une large gamme de souches, et E6 et E8 sont les parents de la population dont la résistance est en cours de cartographie (Lebeau *et al.*, 2010).

2. Tomate (*Solanum lycopersicum*): les accessions sensibles et résistantes

Un cultivar de tomate résistant (T5 : Hawaii 7996) et un sensible (T10 : L390) ont été utilisés pour les tests de pathogénicité (Tableau 5). Hawaii 7996 est le cultivar résistant le plus largement utilisé pour cartographier les gènes de résistance majeurs au flétrissement bactérien. La résistance de ce cultivar est sous le contrôle de plusieurs QTLs (Quantitative Trait Loci) cartographiés (Thoquet *et al.*, 1996).

Tableau 5: Liste des accessions de la core-TEP utilisés

Code	Accession	Espèce	Origine
T5	Hawaii 7996	<i>S. lycopersicum</i>	INRA
T10	L390	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	AVRDC
E1	MM853 Dingras multiple purple	<i>S. melongena</i>	INRA
E6	MM960 AG91-25, SD20	<i>S. melongena</i>	INRA
E8	MM738	<i>S. melongena</i>	INRA

Tableau 6: Composition du mélange réactionnel (1 réaction)

Réactifs	Volume (µL)
H2O HPLC	12,8
10XPCR Buffer	2,5
MgCl2 (25 mM)	1,5
Q Solution 5X	5
dNTPs (10 mM)	0,5
Primer F (100µM)	0,25
Primer R (100µM)	0,25
Red Goldstar Taq (5U/µL)	0,2
TOTAL MIX	23
ADN (10ng/µL) ou cellules	2
TOTAL	25

Tableau 7: Cycles PCR

REACTION PCR	Température	Durée	
Dénaturation initiale	96°C	5 min	
Cycles	95°C	30 s	30 cycles
	Tm-4°C *	60 s	
	72°C	60 s/kb	
Elongation finale	72°C	10 min	
Hold	12°C	∞	

* Tm=Température de fusion

ELECTROPHORESE :

Agarose 2%, et marqueur 100 pb pour fragments < 1.2 kb
marqueur 1 kb pour fragments > 1.2 kb

III. La sélection des gènes T3Es et l'amplification par PCR, étude du génotype

1. Réalisation d'une liste de gènes orthologues aux T3Es candidats

Des couples d'amorces doivent être déterminés pour amplifier les T3Es pendant la PCR. Pour cela, il faut chercher des zones consensus dans des familles de T3Es afin d'être certain d'amplifier le gène ciblé dans les différentes souches. Des familles de gènes orthologues ont été définies à partir des séquences des T3Es présents dans les différents génomes complets et regroupés dans l'interface Web MaGe (Magnifying Genomes, <http://genoscope.cns.fr/microscope/.mage>) sur la plateforme MicroScope. Sur la plateforme MAGE, la recherche d'orthologues aux gènes candidats déjà répertoriés est réalisée en définissant les paramètres suivants :

- L'identité entre les gènes doit être supérieure à 80%
- Les rapports de recouvrement minimaux (MinLrap) et maximaux (MaxLrap) entre les gènes doivent être supérieurs à 90%.

La liste des T3Es et de leurs orthologues est synthétisée dans le tableau 2 (d'après Remenant *et al.*, 2010).

2. Détermination d'amorces

Les séquences des groupes de gènes orthologues sont enregistrées au format fasta et multifasta par le logiciel Seqverter (Genestudio, www.genestudio.com). Un alignement des gènes est ensuite effectué sous Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) avec le programme d'alignement ClustalW (Annexe III). Après alignement, on identifie les zones consensus dans lesquelles vont être dessinées les amorces. L'identification de ces zones permet d'éviter de dessiner les amorces dans des zones polymorphes. Celles-ci risqueraient de ne pas être amplifiées ensuite. Sur certains gènes de grande taille, plusieurs paires d'amorces ont été définies pour pouvoir les amplifier en plusieurs parties. Le design d'amorces a été réalisé avec le programme Primer 3 (Primer 3, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>)

55 couples d'amorces ont donc été définis en s'efforçant de garder les températures de fusion (T_m) proches de 60°C, les tailles de 18 à 25 nucléotides (nt) et d'autres paramètres présentés en annexe IV. Le polymorphisme observé sur certaines séquences a également conduit à dessiner des amorces dégénérées.

3. Amplifications par PCR

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans le but de déterminer la présence ou l'absence des T3Es dans les différentes souches. L'ADN de toutes les souches a été soumis à l'analyse PCR via l'utilisation des amorces spécifiques des T3Es. Pour certains gènes tels que GALA3, AWR6 (Annexe IV), un couple d'amorces amplifie la séquence universelle du gène (la plus longue commune au groupe de gènes d'orthologues) tandis qu'un autre couple amplifie la séquence du gène le plus long, ceci afin de déterminer la présence de polymorphisme de taille au sein d'un gène.

Les mix ont été préparés selon le dosage présenté dans le tableau 6, auquel sont ajoutés 2 μ L d'ADN.

Les amplifications par PCR (Tableau 7) ont été répétées au moins deux fois pour obtenir des résultats reproductibles.



Figure 13: Disposition des plants dans le rotoplant et numérotation dans une terrine (Photo : Flora Pensec)



Figure 14: Isolation des terrines contenant des plants inoculés avec des souches différentes (Photo : Flora Pensec)



Scarification des racines au scalpel

Ajout de 5ml de suspension de bactérie



Figure 15: Méthode d'inoculation des plants : scarification au scalpel et ajout de la suspension de bactéries (Photo : Flora Pensec)

IV. Les tests de pathogénicité : étude du phénotype

Les tests de pathogénicité ont eu lieu en chambre climatique dans un local de Niveau de Sécurité 3 (NS3) en raison de l'utilisation d'une souche émergente (RUN 17).

1. Les conditions de croissance des plants

Les graines d'aubergines et de tomates sont semées en serre respectivement 4 semaines et 3 semaines avant inoculation. Le repiquage des plantules en pots a lieu une semaine après le semis. Les graines sont traitées au Prévicur® contre la fonte des semis et un engrais foliaire (Mairol®) est appliqué chaque semaine après repiquage.

Au stade 3-4 feuilles, les plants sont transférés en chambre climatique (rotoplant) deux jours avant l'inoculation afin qu'ils soient bien adaptés aux conditions de la chambre. Dans la chambre climatique, l'humidité est réglée à 90%, la température est de 30°C le jour et 24°C la nuit, pour une photopériode de 12h. Un engrais foliaire est pulvérisé chaque semaine.

2. Le dispositif d'expérimentation

Les plants étant placés sur un plateau tournant, ils sont soumis aux mêmes conditions (Figure 13). Chaque combinaison souche x cultivar est testée sur deux répétitions de 15 plants placés dans une même terrine (Figure 13). Dans chaque sous jardinière sont placées 2 terrines contenant des plants inoculés par la même souche, pour éviter les contaminations croisées. Si cela n'est pas possible, chaque terrine est isolée à l'aide d'un sac plastique (Figure 14).

3. La méthode d'inoculation des plants

Les bactéries sont mises en culture une semaine avant inoculation selon le même protocole qu'au point I.3. Pour chaque souche et pour une inoculation de 150 plants, l'amas bactérien obtenu est distribué et étalé sur 20 boîtes de milieu Kelman. Après 24h de mise en culture, les pâtés sont prélevés jusqu'à obtention d'une suspension de concentration approximativement égale à 10^8 CFU/mL dans 750mL de tampon Tris. Cette suspension, dont on évalue les concentrations exactes par suspension dilution, est ensuite utilisée comme inoculum (Tableau 8).

L'inoculation est réalisée par ajout de 5mL d'inoculum en surface du substrat de culture des plants après scarification des racines au scalpel (Figure 15).

Tableau 8 : Concentration des différentes solutions d'inoculation

Inoculation 1	concentration en bactéries.mL ⁻¹	Inoculation 2	concentration en bactéries.mL ⁻¹
Run 17	$1,5.10^8$	Run 17	$2,1.10^8$
Run 54	$1,6.10^8$	Run 58	$1,6.10^8$
Run 59	$1,8.10^8$	Run 147	$3,3.10^8$
Run 145	$1,0.10^8$	Run 157	$2,0.10^8$
Run 523	$3,5.10^8$	Run 928	$4,0.10^8$
Run 657	$5,6.10^8$	Run 941	$3,8.10^8$



Figure 16: Evaluation des symptômes sur aubergine : (de gauche à droite) notation 0, notation 1, notation 2, notation 3, notation 4 (Photos : Flora Pensec)



Figure 17: Evaluation des symptômes sur tomate : (de gauche à droite) notation 0, notation 1, notation 2, notation 3, notation 4 (Photos : Flora Pensec)

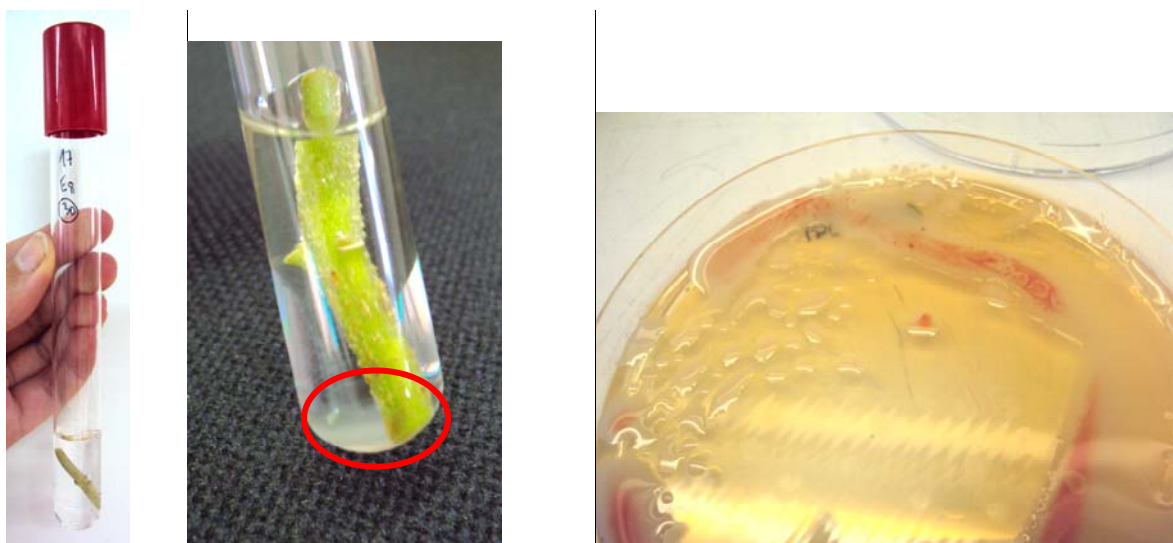


Figure 18: Evaluation des infections latentes (de gauche à droite) : section d'une tige de plant inoculé, diffusion des bactéries dans le Tris, développement de la bactérie après étalement sur milieu de la suspension (Photos : Flora Pensec)

4. L'évaluation du développement de la maladie

La notation des symptômes est réalisée à partir du quatrième jour après inoculation puis tous les 2-3 jours selon l'échelle utilisée par l'équipe de Franck Bertolla (Université Lyon I) :

- 0 : Aucun symptôme (Figures 16 et 17)
- 1 : Une feuille flétrie (Figures 16 et 17)
- 2 : Deux/trois feuilles flétries (Figures 16 et 17)
- 3 : Toutes les feuilles flétries (Figures 16 et 17)
- 4 : Tige pliée (Figures 16 et 17)

Un plant noté 3 ou 4 correspond à un plant flétri. Pour les plants asymptomatiques ou les plants notés 1 ou 2, une détection **d'infection latente** est effectuée à la fin de l'expérience: des sections de 2 cm de tige sont coupées à la base des tiges, transférées dans 5mL de tampon Tris (Figure 18) et laissées 2 heures à température ambiante. 50µL de chaque extrait sont étalés sur milieu Granada et Sequeira et incubés à 28°C pendant 3-4 jours. Les plants asymptomatiques sont notés comme positifs à une infection latente lorsque les colonies caractéristiques de *R.solanacearum* sont observées (Figure 18).

Différents indices peuvent être calculés grâce à la récolte de ces données :

- Le **pourcentage final de plants flétris ou morts** est calculé en relevant à terme les indices de flétrissement de chaque plant :

$$T_{\text{flet}} = \frac{N_3 + N_4}{N_{\text{total}}}$$

T_{flet} : Taux de flétrissement
 N_3 : Nombre de plants notés 3
 N_4 : Nombre de plants notés 4

- En attribuant l'indice « c » aux plants flétris ou pour lesquels une infection latente a été détectée et l'indice « nc » aux autres, un **taux de colonisation** peut être calculé selon la formule suivante:

$$T_{\text{col}} = \frac{N_c}{N_{\text{total}}}$$

T_{col} : Taux de colonisation
 N_c : Nombre de plants « c »
 N_{total} : Nombre de plants total

- L'**évolution de la maladie** par le calcul de l'aire sous la courbe de développement de la maladie (AUDPC) puisque une notation tous les 2-3 jours pendant 28 jours.

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=3}^{28} [(T_{\text{flet } i} + T_{\text{flet } i-1})/2] (t_i - t_{i-1})$$

$T_{\text{flet } i}$: Taux de flétrissement à la date i
 t_i prend l'ensemble des valeurs des dates de notation
 t_{i-1} correspond à la date précédant i, soit 2 ou 3 jours avant i

- Des **classes de virulences** notées de 0 à 5 sont aussi attribuées en combinant les taux de flétrissement et de colonisation finaux (Lebeau *et al.*, 2010) :

- 0 : Aucune colonisation ni flétrissement
- 1 : $T_{\text{flet}} < 13\%$ ET $T_{\text{col}} < 17\%$
- 2 : $T_{\text{flet}} < 33\%$ ET $16\% < T_{\text{col}} < 50\%$
- 3 : $27\% < T_{\text{flet}} < 43\%$ ET $43\% < T_{\text{col}} < 60\%$ ou $T_{\text{flet}} < 37\%$ ET $T_{\text{col}} > 63\%$
- 4 : $40\% < T_{\text{flet}} < 80\%$ ET $T_{\text{col}} > 47\%$
- 5 : $T_{\text{flet}} > 80\%$ ET $T_{\text{col}} > 87\%$

V. L'analyse des données

Les traitements statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R 2.11.1 (R Development Core Team, 2010).

1. Réalisation des groupes de souches aux contenus en effecteurs similaires

Après criblage PCR, les répertoires en effecteurs des différentes souches sont établies en fonction de la présence ou absence de 25 gènes candidats : BA2498, PTO4834, PTO1391, RSp0572, RSc1723, RSc0826, RSp0028, RSc0868, RSp1384, RSp1460, RSp1582, PTO1326, PTO3560, PTO3558, PTO1265, BA7003, RSc1801, RSp0099, RSp1130, RSc2775, RSp0854, PTO7001, RSc1800, RSp0296, RSp0847.

Les profils de répartition d'effecteurs sont codés de la façon suivante pour chaque gène putatif :

1 : amplification, fragment de la taille attendue

2 : absence d'amplification

3 à 6 : amplification, fragment de taille différente de celle attendue

Chaque souche est ainsi décrite par un profil de 25 variables (gènes) qui peuvent prendre 6 états différents.

Nous avons réalisé une classification hiérarchique ascendante des souches de la collection entière en fonction de la présence/absence/polymorphisme des effecteurs:

- Les notes associées à la présence/absence/polymorphisme des effecteurs sont transformées en variables nominales. Une souche ayant un effecteur dont la longueur est différente de celle attendue n'est pas plus proche, a priori, d'une souche ayant l'allèle attendu qu'une souche n'ayant pas cet effecteur.

- Le calcul de la dissimilarité est effectué par « simple matching », rapport de concordance (fonction daisy, module cluster).

- La classification hiérarchique ascendante utilise la méthode de Ward pour construire l'arbre de classification (fonction agnes).

Cette même méthode est utilisée pour classer les souches utilisées pour l'inoculation.

2. Reproductibilité des données des deux dates d'inoculation

La souche RUN17 a été utilisée aux deux dates d'inoculation. L'effet de la date d'inoculation sur les taux de flétrissement et les taux de colonisation est testé par un modèle linéaire général (glm) sur données binomiales avec un test du χ^2 (chi-square) au seuil critique de 5% ; et sur l'AUDPC avec une ANOVA (analyse de la variance) et un test de Fischer au seuil critique de 5%.

3. Distinction des valeurs des taux de flétrissement, taux de colonisation et AUDPC entre les souches

L'effet du facteur « souche » sur les variables « taux de flétrissement » et « taux de colonisation » est testé par un modèle linéaire général (glm) sur données binomiales avec un test du χ^2 (chi-square) au seuil critique de 5% ; et sur l'AUDPC avec une ANOVA (analyse de la variance) et un test de Fischer au seuil critique de 5%.

Un test de comparaison multiple des moyennes basé sur la méthode de Tukey au seuil de 5% est utilisé pour différencier les souches deux à deux (module multcomp et fonction glht).

4. Typologie phénotypique des souches utilisées pour l'inoculation

Une classification hiérarchique ascendante des souches selon leur phénotype a été réalisée de la même manière que la classification du point V.1. en considérant les classes de virulence comme des facteurs ordonnés par ordre croissant de 0 à 5. L'analyse a été réalisée par cultivar.

5. L'analyse factorielle des correspondances entre les phénotypes et les effecteurs

Afin de visualiser l'implication des gènes candidats dans le phénotype des souches, une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée par cultivar en utilisant les données de présence/absence des effecteurs et la classe de virulence des souches sur le cultivar étudié.

C. Résultats

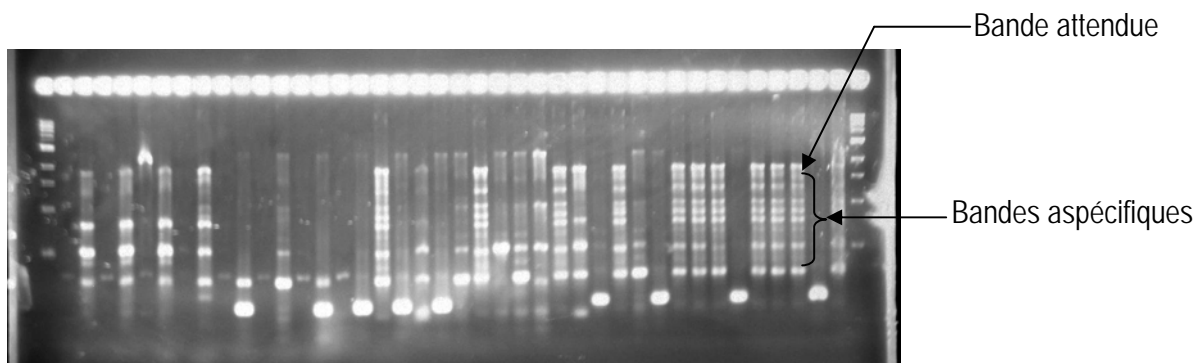


Figure 19: Apparition de bandes aspécifiques lors de l'amplification d'un T3E chez différentes souches

Tableau 9: Association des effecteurs à un phylotype (les probabilités critiques ont été obtenues par un test de χ^2 comparant la distribution des effecteurs réelle à la distribution théorique)

Gène candidat	BA 2498	RSp 0028	RSp 0296	RSp 0099	RSc 2775	RSp 0854	RSp 0847	RSp 0572	RSc 0868	PTO 4834	PTO 3560	PTO 3558	RSp 1460	RSc 1801	RSc 0826
Nom connu	GALA3			SKPW5	AWR2	PopW	HrpZ	AWR4	HopH1	PopP2				GALA5	PopP1
Probabilité critique	0,22	0,82	0,75	0,98	0,98	0,98	0,98	0,14	0,87	0,59	0,08	0,07	4E-05	3E-04	0,02
Significativité Associé au phylotype													***	***	*
													III	III	I

Gène candidat	RSp 1582	RSp 1130	RSc 1800	RSp 1384	RSc 1723	PTO 1391	PTO 7001	PTO 1326	PTO 1265	BA 7003
Nom connu	GALA4			AWR6			SspH1			
Probabilité critique	3E-05	3E-05	3E-05	7E-05	0,01	0,03	0,02	2E-03	6E-03	7E-03
Significativité Associé au phylotype	***	***	***	***	*	*	*	**	**	**
	I & III	I & III	I & III	I & III	I & III	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB

I. Les données génotypiques : présence et polymorphisme des gènes candidats

Le protocole utilisé pour les PCR est celui présenté au point III.3. de la partie matériel et méthodes. Ce protocole a parfois été modifié quand les amplifications entraînaient l'apparition de bandes aspécifiques lors des révélations (Figure 19). Pour augmenter la spécificité d'appariement des amorces, nous avons testé des températures croissantes d'hybridation (PCR gradient) et lorsque cela était nécessaire, nous avons également diminué le nombre de cycles pendant la PCR ou utilisé des suspensions de cellules à 10^8 CFU.mL⁻¹ à la place de l'ADN extrait (Annexe 4).

Certains couples d'amorces n'ont pas permis d'amplifier certains gènes ou fragments de gènes. Dans ce cas, les informations dont on dispose sont données par les couples d'amorces pour lesquels l'amplification a fonctionné. Par conséquent, pour certains effecteurs (PTO1326, BA7003, RSc1800, RSc1801, RSp0296, PTO1391, RSc0868, PTO7001) les données portent sur seulement un fragment de gène et pas le gène entier. Aucune information n'a pu être obtenue pour le gène candidat PTO1808.

1. Mise en évidence de la présence des gènes étudiés dans la collection de souches

L'évaluation de la présence/absence des gènes candidats au sein des collections de souches permet de comprendre la distribution des effecteurs. Certains effecteurs comme RSp0099, RSc2775, RSp0854 et RSp0847 ont été détectés chez toutes les souches étudiées tandis que d'autres sont présents dans un nombre restreint de souches (Tableau 10).

La comparaison des répartitions théoriques et réelles des effecteurs dans les phylotypes révèle que le gène RSc0826 est significativement associé au phylotype I, les gènes RSp1460 et RSc1801 se retrouvent plutôt associés au phylotype III tandis que les gènes PTO1391, PTO1326, PTO1265, BA7003 et PTO7001 sont significativement liés au phylotype IIB. Les gènes RSp1582, RSp1130, RSc1800, RSc1723 et RSp1384 sont retrouvés à la fois dans le phylotype I et le phylotype III (Tableau 9).

Tableau 10: Présence (1)/ absence (0) des différents effecteurs au sein des collections de souches

N° RUN	photype	Groupe génotypique	BA 2498	PTO 4834	PTO 1391	PTO 3560	PTO 3558	BA 7003	PTO 1326	PTO 1265	PTO 7001	RSc 0826	RSp 0572	RSc 1723	RSp 1460	RSc 1801	RSp 1582	Rsp 1130	Rsc 1800	Rsp 1384	RSc 0868	RSp 0296	RSp 0028	RSc 2775	RSp 0854	RSp 0099	RSp 0847
Nom connu			AvrPtoB like	AWR6			SspH1 like				PopP1	HopH1 like	GALA5				GALA4				PopP2	SKWP5	GALA3	PopW	HrpZ	AWR2	AWR4
16	IIB	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
17	IIB		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
18	IIB		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
36	IIA	2	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
58	IIA		0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
150	IIA		1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
147	IIB	3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
654	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
848	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
880	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
913	III		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
623	IIB		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
59	IIB		0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
476	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
697	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
845	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
921	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
923	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
924	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
925	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
926	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
919	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
160	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
928	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
843	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
934	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
931	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
936	IIB		0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
681	IIB		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
941	IIB		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
889	IIB		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
944	IIB		0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
39	IIIB	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
145	IIIA		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
133	IIIA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	IIIC		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
61	IIIC		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
77	IIIC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
523	III		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
693	III		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
54	I	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
215	I		0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
155	I		0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
157	I		0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
471	I		0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
608	I	6	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
657	III		0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
930	I		0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1

Présence de l'effecteur

0

Absence de l'effecteur

Souche utilisée pour l'inoculation

Tableau 11: Polymorphisme de longueur des différents effecteurs au sein des collections de souches

RUN	phylotype	Groupe génotypique	BA 2498	PTO 4834	PTO 1391	PTO 1326	PTO 3560	PTO 3558	BA 7003	PTO 1265	PTO 7001	RSc 0826	RSc 1801	RSp 1460	RSp 0572	RSc 1723	RSp 1384	RSp 1582	RSp 1130	RSc 1800	RSc 0868	RSp 0296	RSp 0028	Rsc 2775	RSp 0854	RSp 0099	RSp 0847	
Nom connu			AvrPtoB like	AWR6	SspH1 like	PopP1			GALA5			HopH1 like			GALA4			PopP2	SKWP5	GALA3	PopW	HrpZ	AWR2	AWR4				
16	IIB	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	1	1	
17	IIB		1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	1	1	
18	IIB		1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	1	1	
36	IIA	2	2	3	2	1	1	1	3	2	2	2	2	3	2	2	1	2	1	2	3	2	2	1	1	1	1	
58	IIA		2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	3	2	1	3	1	1	
150	IIA		1	3	1	1	1	1	1	3	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	3	2	4	1	1	1	1
147	IIB	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	5	1	3	1	1
654	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1	
848	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1	
880	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1	
913	III		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1	
623	IIB		2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1	
59	IIB		2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
476	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
697	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
845	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
921	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
923	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
924	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
925	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
926	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
919	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	5	1	1	1	1
160	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	2	5	1	3	1	1
928	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	5	1	3	1	1
843	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
934	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
931	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	5	1	3	1	1
936	IIB		2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	5	1	3	1	1
681	IIB		2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
941	IIB		2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
889	IIB		2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	3	5	1	3	1	1
944	IIB		2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	5	1	3	1	1
39	IIIB	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	4	1	1	1	1	
145	IIIA		2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2	3	1	4	4	1	1	1	
133	IIIA		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	4	4	1	1	1
60	IIIC		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	1	1	1
61	IIIC		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1
77	IIIC	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1	
523	III		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	4	4	1	1	1	
693	III		2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1
54	I	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	
215	I		2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1
155	I		2	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1
157	I		2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	3	1	1	1	1	2	1	3	3	1	1	1
471	I		2	3	2	2	1	1	2	2	2	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
608	I	6	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
657	III		2	3	1	2	1	1	1	3	1	2	2	1	4	2	2	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1
930	I		2	3	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	3	1	6	1	1	1	1

1

Présence de l'effecteur à la longueur attendue

2

Absence de l'effecteur

3

Présence de l'effecteur à une longueur différente de celle attendue

4

5

6

Souche utilisée pour l'inoculation

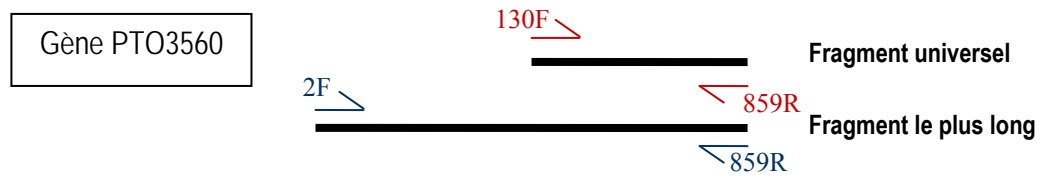


Figure 20: Dessin d'amorces sur un groupe d'orthologues de taille différente

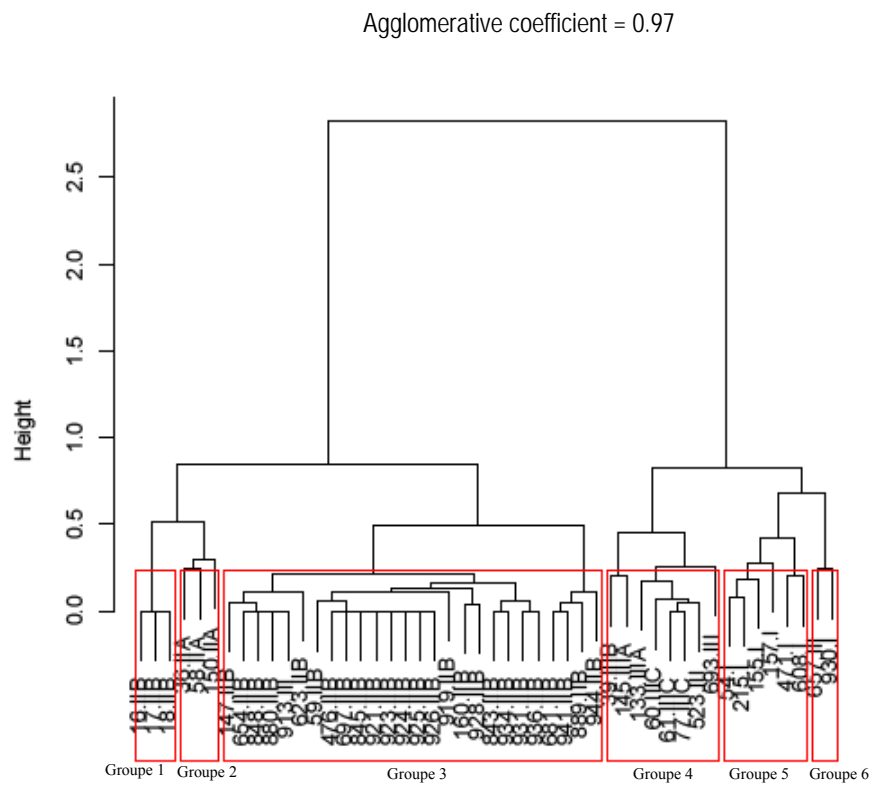


Figure 21: Classification hiérarchique ascendante des souches selon leur répertoire d'effecteurs: distinction de 6 groupes (les souches sont identifiées par leur numéro RUN et leur position phylogénétique)

2. Etude des gènes présents : polymorphisme de longueur allélique

Lors de l'amplification des gènes candidats, du polymorphisme de longueur a pu être détecté (Tableau 11). Ce polymorphisme a différentes sources :

- Un unique couple d'amorce permet d'amplifier des fragments de longueurs différentes selon les souches. C'est le cas de RSc0868 (PopP2) pour lequel la longueur attendue était de 980bp et des amplifications à 900bp ont été observées pour certaines souches. Le polymorphisme de longueur observé pour BA7003 est aussi expliqué par ce phénomène.

- Pour les gènes amplifiés par plusieurs amorces, le polymorphisme de longueur s'explique par l'amplification par certaines amorces et pas par d'autres. Par exemple, deux couples d'amorces ont été dessinés pour amplifier PTO3560 : un couple amplifie le plus long fragment du groupe d'orthologues et un autre couple amplifie un fragment plus court (Figure 20, Annexe 4). Selon la souche, l'amplification a eu lieu pour un couple uniquement (noté 1) ou pour l'autre (noté 3) ou pour les deux (noté 4). L'absence de l'effecteur est notée 2 (Cf Matériel et méthodes V.1.). Les gènes candidats RSp0847 (*popW*), RSc2775 (*AWR4*) et RSp0028 (*GALA3*) présentent aussi du polymorphisme de longueur dû au dessin de plusieurs couples d'amorces. Les gènes RSc2775 et RSp0847 détectés chez toutes les souches (Cf I.1) se différencient en fait par du polymorphisme de longueur (Tableau 11).

3. Réalisation de groupes de souches au contenu similaire en T3Es

Une analyse multivariée a permis de regrouper les souches selon leur répertoire d'effecteurs afin de pouvoir choisir des souches représentatives de la diversité du contenu en effecteurs pour l'inoculation. Cette analyse tenant compte du polymorphisme de longueur est réalisée sans *a priori* sur la contribution des effecteurs dans la virulence. Six groupes ont été retenus pour leur représentativité de la diversité et leur relative homogénéité en contenu d'effecteurs (Figure 21). Les groupes 1 et 2 ont une composition similaire en effecteurs mais ont été séparés car le groupe 2 rassemble des souches qui possèdent certains effecteurs d'avirulence comme RSp1384 et RSc0868. Au contraire, les groupes 3 et 4 regroupent des souches au contenu en effecteurs quasiment opposé (mis à part les gènes présents chez toutes les souches), c'est-à-dire que les gènes absents chez un groupe sont présents chez l'autre. L'intérêt de cette distinction sera de vérifier si les souches contenues dans ces groupes ont des phénotypes opposés.

Tableau 12: Lien entre le répertoire d'effecteurs (groupe) et le phylotype des souches

N°RUN	Phylotype	Collection	Groupe génotypique
16	IIB	Core RS2	1
17	IIB	Core RS2	
18	IIB	Core RS2	
36	IIA	Core RS2	2
58	IIA	Réunion	
150	IIA	Core RS2	
147	IIB	Core RS2	3
654	IIB	Réunion	
848	IIB	Réunion	
880	IIB	Réunion	
913	III	Réunion	
623	IIB	Réunion	
59	IIB	Réunion	
476	IIB	Réunion	
697	IIB	Réunion	
845	IIB	Réunion	
921	IIB	Réunion	
923	IIB	Réunion	
924	IIB	Réunion	
925	IIB	Réunion	
926	IIB	Réunion	
919	IIB	Réunion	
160	IIB	Réunion	
928	IIB	Réunion	
843	IIB	Réunion	
934	IIB	Réunion	
931	IIB	Réunion	
936	IIB	Réunion	
681	IIB	Réunion	
941	IIB	Réunion	
889	IIB	Réunion	
944	IIB	Réunion	
39	IIIB	Core RS2	4
145	IIIA	Core RS2	
133	IIIA	Core RS2	
60	IIIC	Réunion	
61	IIIC	Réunion	
77	IIIC	Réunion	
523	III	Réunion	
693	III	Réunion	
54	I	Core RS2	5
215	I	Core RS2	
155	I	Core RS2	
157	I	Core RS2	
471	I	Réunion	
608	I	Réunion	
657	III	Réunion	6
930	I	Réunion	

Tableau 13: Valeurs des probabilités critiques permettant de comparer les deux dates d'inoculation (la différence entre les deux dates est non significative lorsque la probabilité critique est inférieure à 5%)

Cultivar	Probabilité Critique		
	AUDPC	Flétrissement	Colonisation
E1	0,09	0,06	0,16
E6	0,31	0,22	0,75
E8	0,06	0,06	0,09
T10	0,88	1,00	1,00
T5	0,33	0,01	0,06

4. Relation entre le répertoire d'effecteurs et le phylotype des souches

Les groupes de souches réalisés selon leur contenu en effecteurs peuvent être comparés aux groupes phylogénétiques (Tableau 12). Les groupes réalisés associent des souches de même phylotype en général : le groupe 1 est composé des trois souches émergentes de Martinique appartenant au phylotype IIB séquévar 4 NPB (Non Pathogenic on Banana). Le groupe 2 regroupe toutes les souches du phylotype IIA. Le groupe 3 rassemble le reste des souches du phylotype IIB et une souche du phylotype III. Le groupe 4 est composé de souches du phylotype III uniquement tandis que le groupe 5 contient des souches du phylotype I. Le groupe 6 associe une souche appartenant au phylotype I et une du phylotype III.

5. Choix des souches pour les inoculations

Compte tenu des restrictions spatiales liées à l'utilisation d'un local de Niveau de Sécurité 3 (NS3), nous avons uniquement pu utiliser 11 souches pour les inoculations. Ces souches ont donc été choisies dans les 6 groupes pour la représentativité de leur répertoire d'effecteurs et leur diversité phylotypique. Ces souches sont : 17 (Groupe 1), 58 (Groupe 2), 59, 147, 928 et 941 (Groupe 3), 145, 523 (Groupe 4), 54, 157 (Groupe 5) et 657 (Groupe 6). (Tableau 11)

II. Les données phénotypiques : taux de flétrissement, indice de colonisation, aire sous la courbe de développement de la maladie (AUDPC)

1. Reproductibilité des données des deux inoculations

1.1. Les plants témoins

A chaque inoculation, des plants témoins ont été placés dans la même chambre climatique que les plants inoculés afin de détecter d'éventuelles contaminations. Les plants témoins ont aussi présenté des feuilles flétries sans pour autant être colonisés par la bactérie. Dans l'analyse qui suit, seules les notations 3 et 4 (flétrissement complet) ont donc été retenues.

1.2. La comparaison des données répétées aux deux dates

Les inoculations ont été réalisées à deux dates différentes. Afin de pouvoir comparer l'agressivité de l'ensemble des souches utilisées, il est nécessaire de vérifier que la date d'inoculation n'a pas d'effet significatif sur les résultats de maladie. L'effet date a donc été testé sur les données de maladie provoquées par RUN17, souche inoculée sur les mêmes cultivars aux deux dates. La comparaison des taux de flétrissement, taux de colonisation et des valeurs de l'AUDPC indique que les résultats ne sont pas significativement différents d'une date à l'autre (Probabilité critique > 5%) (Tableau 13). Nous avons donc pu regrouper les données d'inoculation aux deux dates pour l'analyse

Taux de flétrissement

Taux de colonisation

AUDPC

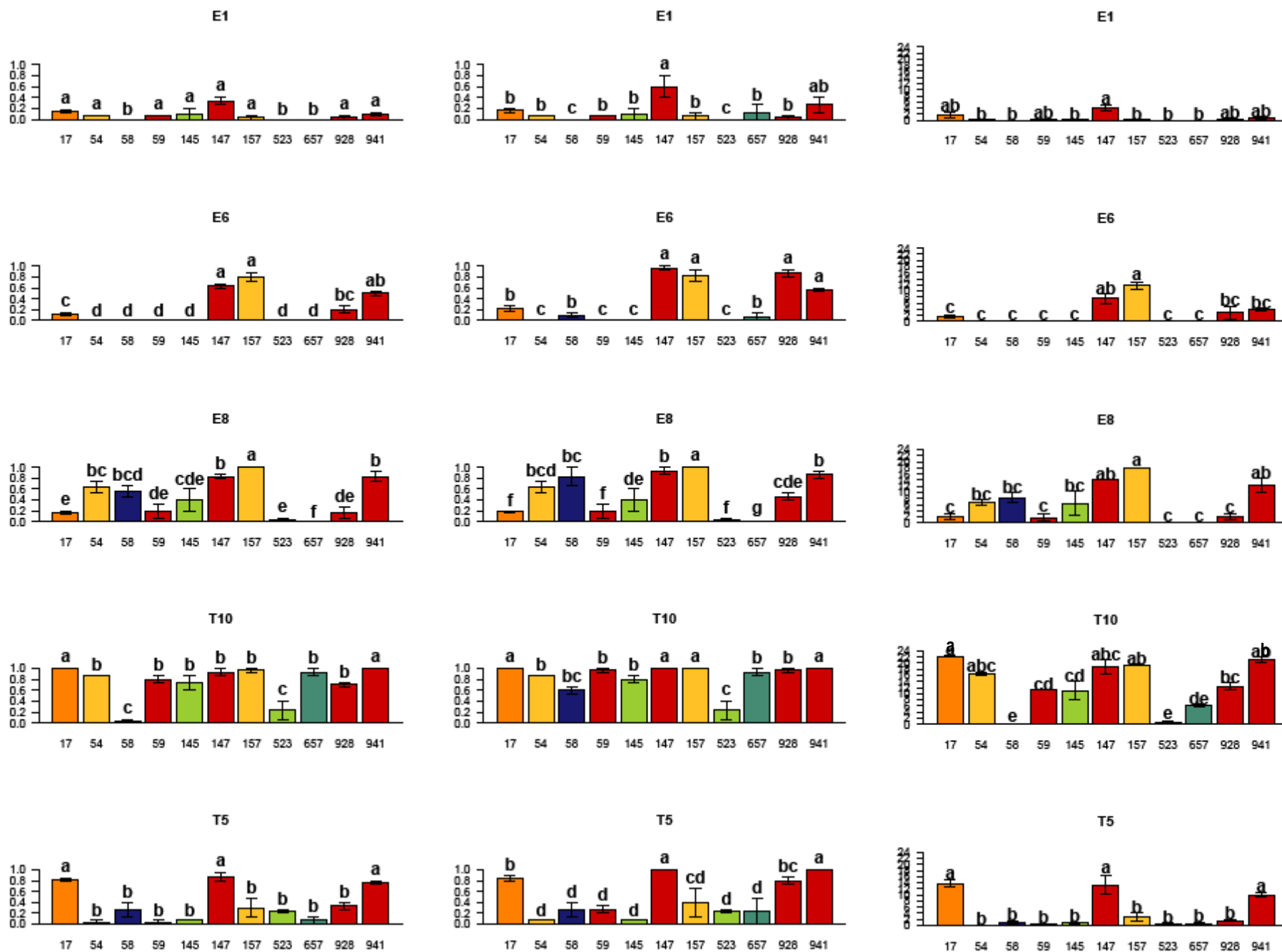


Figure 22: Histogrammes des taux de flétrissement, taux de colonisation et AUDPC pour chaque cultivar

Les groupes représentés par des couleurs différentes rassemblent les souches ayant des répertoires d'effecteurs similaires, ils ont été réalisés à partir de l'analyse génotypique

2. Analyse des données obtenues sur plants sensibles (T10 et E8)

Les souches seront nommées d'après leur numéro RUN.

L'utilisation de cultivars connus comme sensibles permet de repérer les souches très peu virulentes et de vérifier l'agressivité des autres souches

2.1. Sur tomate sensible T10 (Figure 22)

Les souches n'ont pas toutes été très agressives sur T10. En effet, les souches 58 et 523 ont provoqué très peu de flétrissement (moins de 20%). Cependant, malgré le peu de symptômes observés, la souche 58 a un taux de colonisation supérieur à 60%. La souche 523 est donc la seule souche considérée comme très peu agressive sur T10. Toutes les autres souches ont causé le flétrissement ou la mort de plus de 60% des plants. Le calcul de l'AUDPC étant basé sur le taux de flétrissement, les souches 58 et 523 sont celles pour lesquelles l'AUDPC est la plus faible. Cependant, la souche 657 qui a causé un flétrissement important des plants a une AUDPC faible qui s'explique par l'apparition tardive des symptômes.

2.2. Sur aubergine sensible E8 (Figure 22)

De même que pour T10, les souches n'ont pas toutes été très agressives sur E8. Les souches 17, 59, 523, 657 et 928 sont celles qui ont causé le moins de flétrissement (moins de 20%). Cependant, la souche 928 a colonisé environ 40% des plants. Les souches 54, 58, 147, 157 et 941 ont causé le flétrissement de plus de 60% des plants. A vu de leurs faibles taux de colonisation, les souches 17, 59, 523 et 657 seront donc considérées comme très peu agressives sur ce cultivar.

3. Analyse des données obtenues sur plants résistants (T5, E1 et E6)

3.1. Sur tomate résistante T5 (Figure 22)

Les souches ayant généré le plus de symptômes sur T5 sont 17, 147 et 941 (taux de flétrissement supérieurs à 60%) et la souche 928 a un taux de colonisation aussi élevé que ces souches malgré un taux de flétrissement inférieur ; tandis que les souches 54 et 145 ont provoqué le flétrissement et colonisé moins de 20% des plants.

3.2. Sur l'aubergine résistante E1 (Figure 22)

E1 est le cultivar le plus résistant car aucune souche n'a provoqué de taux de flétrissement élevé de façon significative. Cependant, la souche 147 qui avait généré un taux de flétrissement légèrement supérieur à celui des autres souches a colonisé les plants à un taux significativement plus important (plus de 50% des plants étaient colonisés). Toutes les autres souches ont provoqué peu de symptômes et ont également très peu colonisé ce cultivar.

3.3. Sur l'aubergine résistante E6 (Figure 22)

Les souches 147, 157 et 941 ont provoqué des taux de flétrissement supérieurs à 50% ainsi que des taux de colonisation élevés. La souche 928 qui avait causé un taux de flétrissement d'environ 20% sur ce cultivar a colonisé environ 80% des plants. Le reste des souches a peu colonisé E6

Les classements d'AUDPC sont similaires à ceux des taux de flétrissement. Les symptômes ont donc progressé de la même manière pour les souches virulentes sur les cultivars résistants.

Tableau 14: Classes de virulence par cultivar pour les différentes souches

souche	E1	E6	T5	E8	T10
17	2	2	4	2	5
54	1	0	1	4	5
58	0	1	2	4	2
59	1	0	2	2	4
145	1	0	1	3	4
147	3	4	5	5	5
157	1	4	2	5	5
523	0	0	2	1	2
657	1	1	2	0	5
928	1	3	3	2	4
941	2	4	5	5	5

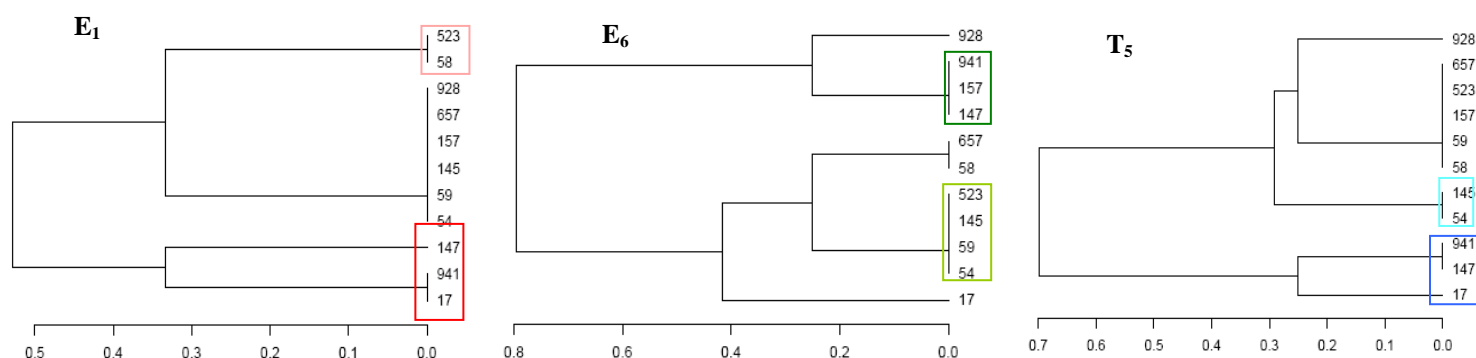


Figure 23: Arbres réalisés à partir des données phénotypiques par cultivar (les souches les plus virulentes sont encadrées en foncé et les souches les moins virulentes en clair, E1 est représenté par la couleur rouge, E6 par le vert et T5 par le bleu)

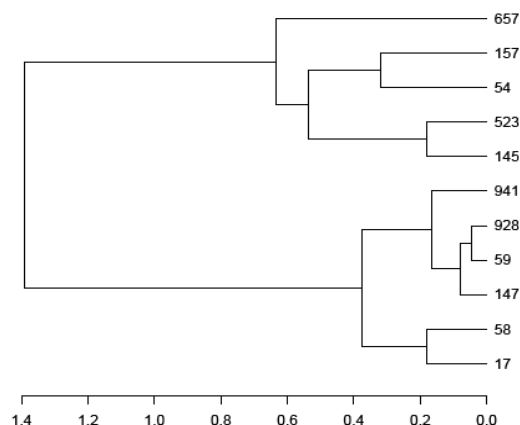


Figure 24: Classification hiérarchique des souches inoculées selon leur composition en effecteurs de type 3

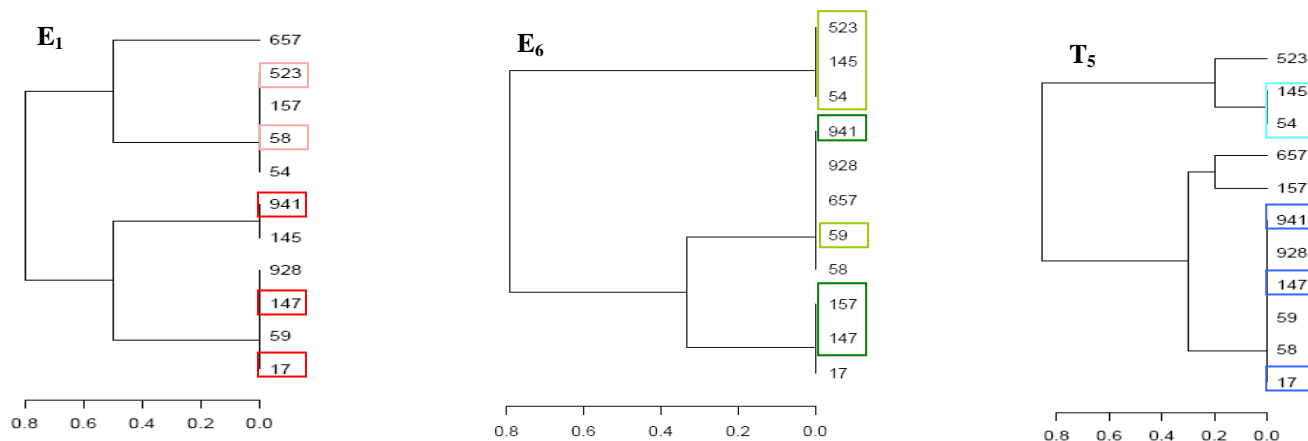


Figure 25: Arbres de classification, par cultivar, des souches selon leur composition en effecteurs de type 3 les plus associés au phénotype. Sur E1, les T3Es sélectionnés sont RSp1384 et PTO1391 ; sur E6, RSp1384, RSp1130, PTO1326 et PTO7001 expliquent la répartition des souches et enfin la classification sur T5 est basée sur la présence/absence de RSc0826, RSp1130, PTO3560, PTO3558 et BA7003

4. Réalisation de groupes de souches au phénotype similaire

Des classes de virulence ont été déterminées à partir des taux de flétrissement et de colonisation (Cf IV.4. du matériel et méthodes). Une classe est associée à chaque couple souche x cultivar (Tableau 14), ce qui permet de regrouper les souches ayant un phénotype similaire sur un cultivar donné.

La classification des phénotypes des souches sur **E1** permet d'obtenir deux clusters séparant les souches 17, 941 et 147 du reste des souches avirulentes (Figure 23).

Pour le cultivar **E6**, les souches virulentes 928, 941, 157 et 147 sont groupées dans un sous-cluster. Les souches avirulentes 657, 58, 523, 145, 59 et 54 le sont également. La souche 17 est isolée du reste des souches mais associée au cluster des souches avirulentes (Figure 23).

Les souches virulentes sur **T5** (941, 17 et 147) sont regroupées dans le même sous-cluster. Une autre sous-division associe les souches avirulentes 145 et 54 ; un troisième groupe rassemble le reste des souches (Figure 23).

III. Confrontation des données phénotypiques et génotypiques

Seules les onze souches utilisées dans l'inoculation et les cultivars résistants ont été considérés dans cette partie.

1. Comparaison des classifications phénotypiques et de la classification génotypique

L'arbre de classification des souches de l'inoculation selon leur contenu global en T3Es a été réalisé de la même manière que celui traitant toutes les souches de la collection (Figure 24). La comparaison des arbres phénotypiques et de la classification génotypique révèle que l'ensemble des effecteurs de type 3 n'explique pas la répartition phénotypique des souches. Par exemple, selon leurs données génotypiques, les souches 58 et 17 sont regroupées dans le même sous-cluster alors qu'elles ont des phénotypes différents (Figures 23 et 24). La souche 58 est faiblement virulente sur les plants résistants tandis que 17 est très virulente sur T5. De même, les souches 54 et 157 ont un phénotype très différent sur E6 (avirulence pour l'une et forte virulence pour l'autre) mais elles sont génétiquement regroupées dans le même sous-cluster (Figures 23 et 24).

2. Identification des effecteurs les plus associés aux phénotypes

L'hypothèse qu'un nombre réduit d'effecteurs explique les phénotypes des souches par cultivar a donc été testée. Dans chaque arbre phénotypique, le contenu en effecteurs des souches les plus virulentes d'une part et des souches avirulentes d'autre part a été comparé.

Les classifications tenant compte de la présence/absence des effecteurs et celles tenant compte du polymorphisme sont quasiment identiques (seule la souche 657 change de cluster), les analyses permettant la corrélation entre le répertoire d'effecteurs et le phénotype des souches ont donc été basées uniquement sur la présence/absence des gènes.

2.1. Identification des effecteurs identiques (présents ou absents) chez des souches du même groupe phénotypique

Cas des cultivars E1 et T5 :

Les gènes qui étaient soit présents chez toutes les souches virulentes, soit totalement absents chez ces mêmes souches ont été relevés. La même procédure a été appliquée pour les souches avirulentes. Les gènes absents chez les souches virulentes et présents chez les souches avirulentes ainsi que les gènes présents chez les souches virulentes et absents chez les souches avirulentes ont été utilisés pour refaire une classification génotypique des souches.

Pour le cultivar E1, les gènes relevés sont PTO1391 (AWR6) et RSp1384. Pour le cultivar T5, les gènes utilisés pour la classification sont RSc0826, RSp1130, PTO3560, PTO3558 et BA7003.

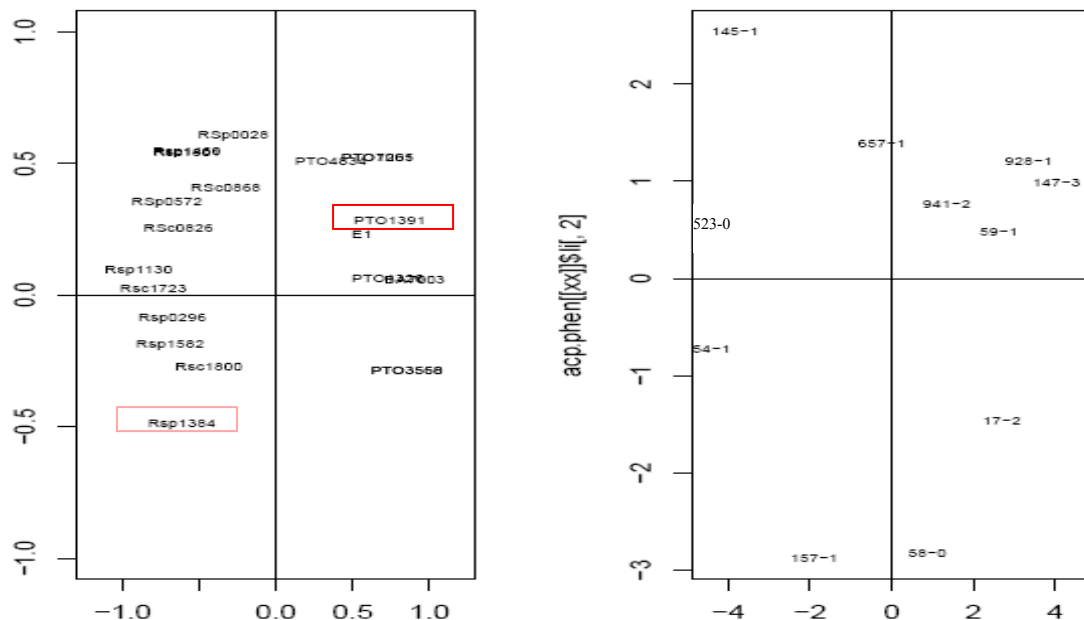


Figure 26: Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur E1, d'après une analyse factorielle des correspondances (« 523-0 » correspond à « n°RUN de la souche – classe de virulence sur E1 »)

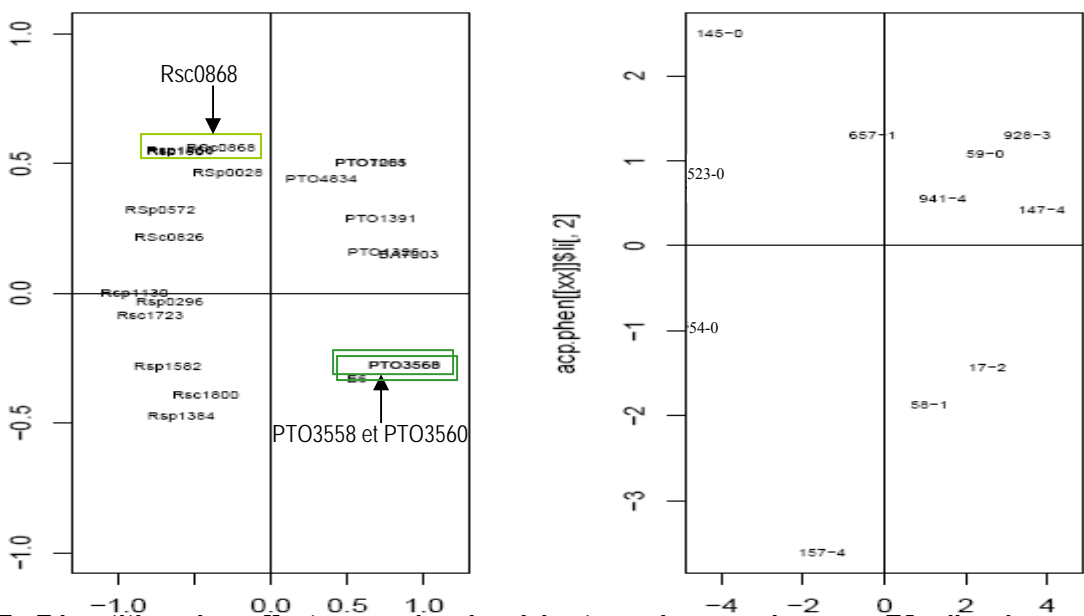


Figure 27: Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur E6, d'après une analyse factorielle des correspondances (« 523-0 » correspond à « n°RUN de la souche – classe de virulence sur E6 »)

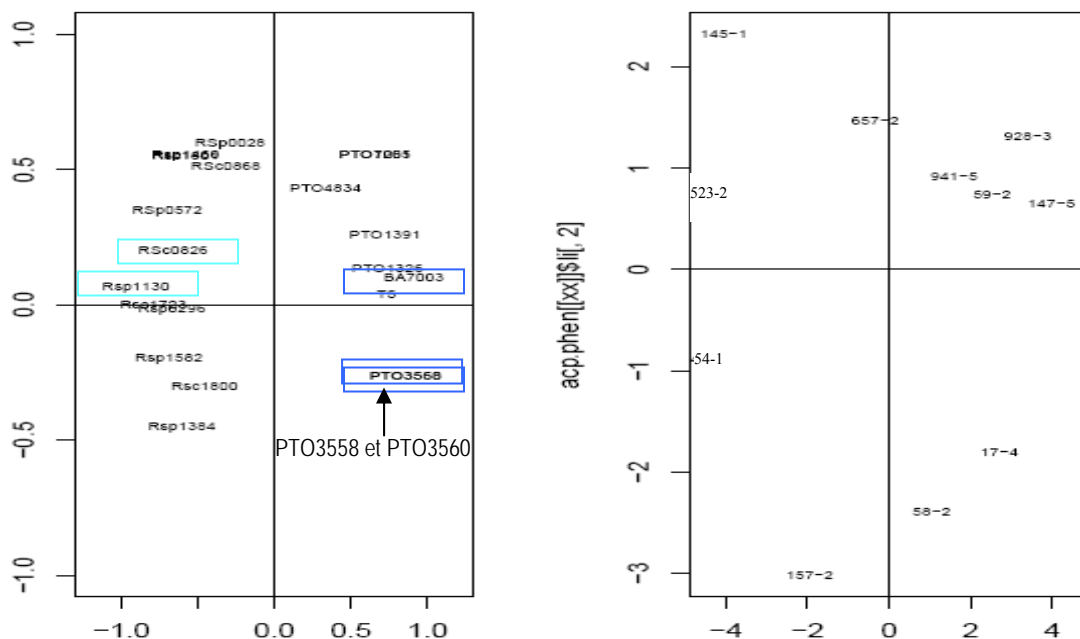


Figure 28: Répartition des effecteurs selon le phénotype des souches sur T5, d'après une analyse factorielle des correspondances (« 523-0 » correspond à « n°RUN de la souche – classe de virulence sur T5 »)

Cas du cultivar E6 :

La comparaison du contenu en effecteurs des souches très agressives et avirulentes sur E6 ne donne pas de profils tranchés (absence ou présence totale d'un gène chez les souches de même phénotype). Le choix des gènes a donc été fait par rapport aux tendances en termes de présence/absence des gènes chez les souches aux phénotypes différents. Les souches 147, 157 et 941 contiennent toutes les gènes PTO3558 et PTO3560 alors que les souches avirulentes (sauf 59) ne les possèdent pas. Inversement, le gène RSc0868 (PopP2) est présent chez toutes les souches avirulentes et absent chez les souches agressives (sauf 941). Ces gènes ont donc été sélectionnés pour reconstruire la classification génotypique répartissant les souches selon leur agressivité sur E6.

2.2. Identification des effecteurs les plus associés aux phénotypes

La construction de nouveaux arbres tenant compte uniquement des gènes sélectionnés n'est pas une nouvelle analyse, elle permet cependant de visualiser l'implication des gènes sélectionnés dans le phénotype des souches.

Dans les figures 26, 27 et 28, le graphe de gauche représente la répartition des effecteurs étudiés selon leur présence dans les souches tandis que le graphe de droite permet de visualiser la répartition des souches selon leur phénotype.

Cultivar E1:

La nouvelle classification selon la présence/absence de PTO1391 et RSp1384 permet de distinguer deux clusters : (i) les souches très agressives et (ii) les souches avirulentes. Les autres souches sont réparties dans ces deux clusters (Figure 25).

D'après l'analyse AFC (Figure 26), ces gènes sont associés à des phénotypes opposés, PTO1391 semble plutôt présent chez les souches agressives sur E1 tandis que RSp1384 est présent chez les souches avirulentes.

Cultivar E6:

Les gènes PTO3558, PTO3560 et RSc0868 semblent expliquer de façon prépondérante les différences phénotypiques entre les souches virulentes 147 et 157 et les souches avirulentes 523, 145 et 54 (Figure 25). Les souches 941 et 59 se retrouvent dans la même branche de l'arbre alors qu'elles ont un phénotype différent, mais ce sont aussi ces souches qui étaient les exceptions lors du choix des gènes. Elles sont localisées dans la même branche que les souches au phénotype intermédiaire.

L'analyse AFC confirme que les gènes PTO3558 et 3560 sont plutôt associés aux souches agressives tandis que le gène RSc0868 est associé de façon importante (un des gènes les plus distants du centre du graphique) aux souches avirulentes (Figure 27).

Cultivar T5:

La classification tenant compte uniquement des gènes RSc0826, RSp1130, PTO3560, PTO3558 et BA7003 permet de regrouper les souches les plus agressives dans une même branche et les souches avirulentes dans une même autre branche (Figure 25). Les souches 58, 59 et 928 sont également présentes dans la même branche que les souches virulentes, mais ce sont des souches ayant la capacité de coloniser et de produire un peu de flétrissement sur ce cultivar (Figures 25 et 22).

L'analyse AFC révèle que les gènes PTO3560, PTO3558 et BA7003 sont particulièrement associés à de la virulence sur T5 tandis que les gènes RSc0826 et RSp1130 sont associés aux souches avirulentes (Figure 28).

D. Discussion

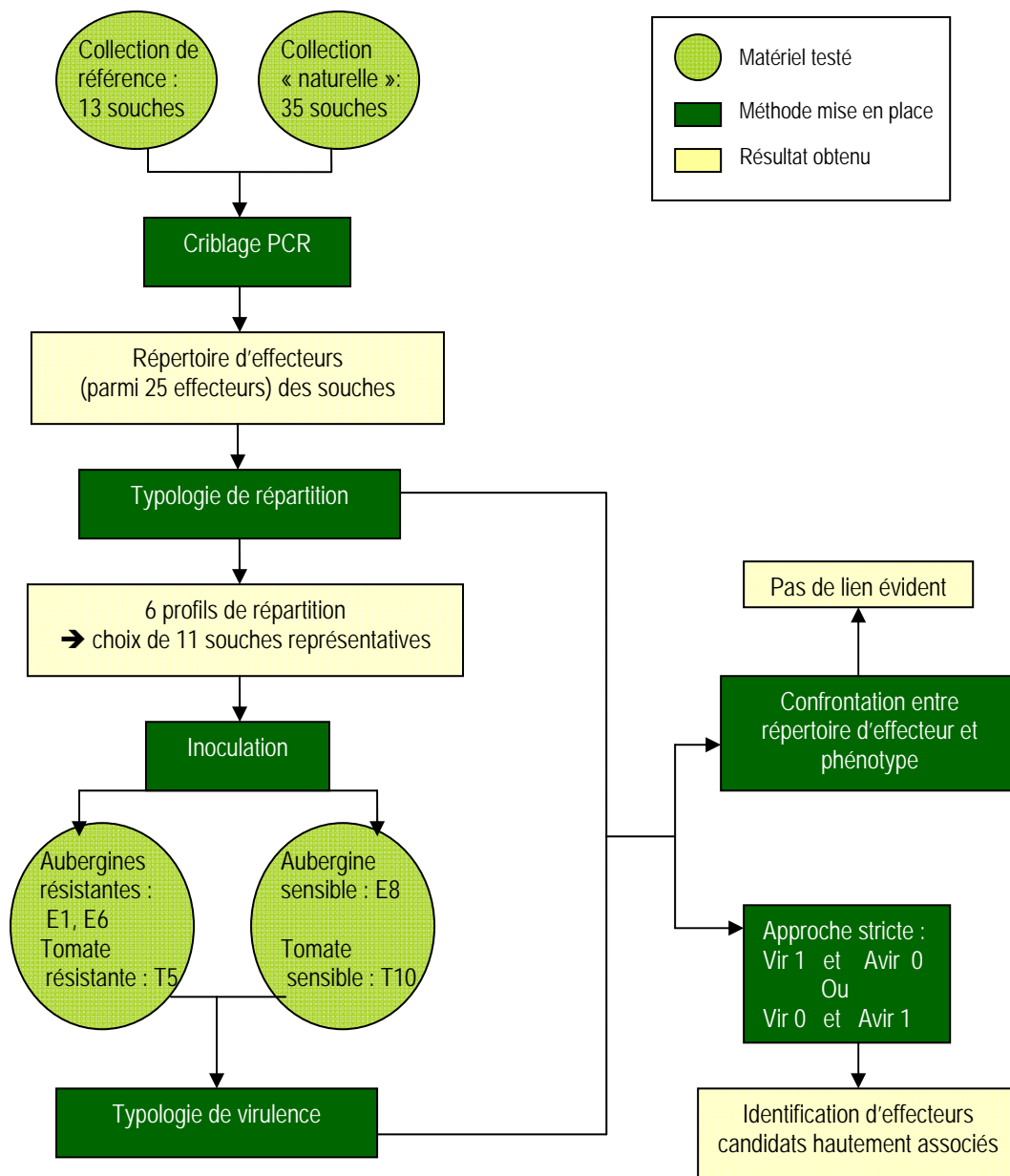


Figure 29 : Schéma récapitulatif de la démarche adoptée

Le schéma récapitulatif de la démarche adoptée est présenté figure 29.

I. La distribution des effecteurs se structure en six profils

L'étude réalisée permet de comprendre la répartition des effecteurs de type 3 au sein d'une large gamme de souches phylogénétiquement diverses et dont certaines proviennent d'une même zone géographique. Certains effecteurs ont été retrouvés chez toutes les souches avec le même allèle (RSp0099 : AWR2 et RSp0847 : AWR4), d'autres sont présents chez toutes les souches mais avec des allèles différents (RSp0854 : HrpZ et RSc2775 : PopW ; deux harpines), et le reste des effecteurs a une distribution variable selon les souches. Ces observations sont également notées par Guidot *et al.* (2007) via une analyse sur puce 5K dans laquelle l'ensemble des effecteurs connus chez GMI1000 étaient testés.

Une variation dans la distribution des effecteurs était donc un résultat attendu, et la détection du polymorphisme des effecteurs constitue donc un volet exploratoire de notre étude. Le polymorphisme considéré dans cette étude est le polymorphisme de longueur. Ce polymorphisme a notamment été détecté lors du design d'amorces, car après alignement des gènes orthologues il a été difficile de trouver des zones consensus, donc des zones conservées dans l'ensemble des gènes. Après analyse par PCR, du polymorphisme de longueur est aussi observé, particulièrement pour les effecteurs amplifiés par plusieurs couples d'amorces, c'est-à-dire pour les effecteurs assez longs (plus de 2kb) ou pour ceux pour lesquels on retrouve des orthologues de taille différente chez les souches séquencées. Ces variations de taille suggèrent la présence de séquences insertionnelles ou de mutations qui pourraient altérer la fonction des effecteurs de type 3 et modifier le phénotype de certaines souches. Cette hypothèse doit être testée par séquençage des effecteurs amplifiés dans la collection de souches, ce qui n'a pas pu être réalisé dans cette étude (détails des apports de cette méthode au point III).

En outre, d'après notre criblage PCR sur nos deux collections de souches, la distribution des effecteurs concorde avec la phylogénie de *R. solanacearum* au niveau des phylotypes. Parmi les 25 effecteurs candidats qui ne représentent qu'une partie des effecteurs connus chez cette bactérie, on distingue quatre effecteurs présents chez les trois phylotypes alors que certains effecteurs sont liés à un phylotype particulier (Tableau 9). Ce résultat est en contradiction avec les observations de Remenant *et al.*, 2010 selon laquelle la distribution phylogénétique des souches est différente de la distribution des souches liée à leur répertoire de T3Es. Cette contradiction peut s'expliquer aisément par le nombre de souches considérées : leur étude a été réalisée sur six souches uniquement et ceci ne permet donc pas de comparer la répartition des effecteurs et la phylogénie de façon robuste.

Le criblage PCR a donc permis de connaître le répertoire d'effecteurs (parmi 25 effecteurs candidats) de chacune des souches de nos collections. La classification de ces souches a permis de mettre en évidence 6 groupes représentatifs des profils observés parmi lesquels les 11 souches utilisées pour les inoculations ont été choisies.

Tableau 15 : Comparaison des classes de virulence de cette étude avec celles de Lebeau *et al.*, 2010

N° RUN	E1		E6		T5	
	Lebeau <i>et al.</i>	Notre étude	Lebeau <i>et al.</i>	Notre étude	Lebeau <i>et al.</i>	Notre étude
17	4	2	4	2	4	4
54	0	1	3	0	1	1
147	1	3	5	4	5	5
157	2	1	5	4	2	2

II. Certains effecteurs sont associés à des phénotypes tranchés sur les cultivars étudiés

Certaines souches utilisées pour la confrontation core-TEP/core-RS2 de Lebeau *et al.*, 2010 ont également été utilisées dans cette étude. Il est donc possible de comparer les classes de virulence de chacune de ces souches sur les cultivars résistants (Tableau 15).

Les données obtenues sur T5 sont identiques dans les deux études, mais des différences sont observées sur aubergine. La souche 17 a une virulence moindre sur les deux cultivars résistants d'aubergine que celle qui a été notée par Lebeau *et al.*(2010). RUN 54 est également moins virulente sur E6, tandis que RUN 147 est plus virulente sur E1 que lors de l'étude précédente.

Ceci peut s'expliquer par une différence de stade des plants lors de l'inoculation, des plants plus développés étant plus résistants que de jeunes plants. De plus, les conditions de la chambre climatique ont entraîné le flétrissement ainsi que des nécroses de feuilles de plants témoins. Ces événements ont pu provoquer des réactions de la plante qui ont eu une influence sur l'agressivité des souches. La cause des différences d'agressivité de RUN 17 peut aussi être liée à une perte de virulence de cette souche.

Les inoculations ont permis d'associer une classe de virulence aux 11 souches dont on connaît le répertoire d'effecteurs. Il semble clair à présent qu'un répertoire entier d'effecteurs n'explique pas le phénotype d'une souche. En effet, les groupes rassemblant des souches à répertoire similaire regroupent des souches dont le phénotype diffère. La différenciation phénotypique des souches semblerait plutôt associée à la présence/ absence de certains effecteurs.

Différentes stratégies d'association des effecteurs aux phénotypes de nos 11 souches ont donc été testées. Une première approche par Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) permet de comprendre quels sont les effecteurs qui sont globalement associés à de la virulence ou à de l'avirulence sur les cultivars résistants. Cependant, la stratégie adoptée dans cette étude a été un tri strict, par cultivar, des effecteurs à la fois présents chez les souches virulentes et absents chez les souches avirulentes (effecteurs de virulence) et inversement (effecteurs d'avirulence). Cette stratégie permet de connaître les effecteurs qui seraient associés à des phénotypes tranchés.

D'après nos résultats, le nombre et la nature des effecteurs associés à des phénotypes tranchés diffèrent selon le cultivar. Pour le cultivar T5, une combinaison de cinq gènes (PTO3560, PTO3558, BA7003, RSc0826 et RSp1130) semble associée à la virulence ou l'avirulence des souches. Une combinaison de deux gènes (PTO1391 et RSp1384) a été mise en évidence pour le cultivar E1 et enfin trois gènes (PTO3558, PTO3560 et RSc0868) expliqueraient le phénotype des souches sur E6. Ceci ne signifie pas que la combinaison de ces gènes est à elle seule capable de générer des symptômes ou d'activer les défenses de la plante, mais qu'en général cette combinaison est associée à un phénotype tranché sur les cultivars étudiés.

Tableau 16: Correspondance entre les effecteurs et les phénotypes associés dans cette étude ou dans l'étude préliminaire.

Gène	Description	Phénotype primitivement associé (données Lebeau <i>et al.</i> vs Guidot <i>et al.</i>)	Phénotype dans cette étude
PTO1391	AWR6	Virulence sur E1, sur E6, sur T5	Virulence sur E1
PTO3558		Virulence sur E1, sur E6, sur T5	Virulence sur E6, sur T5
PTO3560		Virulence sur T5	Virulence sur E6, sur T5
BA7003		Virulence sur E1	Virulence sur E6
RSp1384		Avirulence sur E6	Avirulence sur E1
RSc0868	PopP2	Avirulence sur E6	Avirulence sur E6
RSc0826	PopP1	Avirulence sur E6	Avirulence sur T5
RSp1130		Avirulence sur E1	Avirulence sur T5

Dans le tableau 2, des phénotypes avaient déjà été associés aux effecteurs par combinaison de deux études (Lebeau *et al.*, 2010 ; Guidot *et al.*, 2007). Les phénotypes associés dans cette étude sont comparés à ceux de l'étude initiale dans le tableau 16. Les gènes associés à de la virulence ou à de l'avirulence lors de la première analyse le sont aussi dans cette étude, avec quelques différences. Par exemple, BA7003 qui était associé à de la virulence sur E1 semble plutôt associé à de la virulence sur E6 dans notre étude. Ces résultats ne sont pas pour autant contradictoires, car la méthode utilisée pour associer les effecteurs à un phénotype est différente dans les deux études. Dans notre étude, seuls les gènes à la fois présents chez des souches virulentes et absents chez des souches avirulentes (et inversement) sont associés à un phénotype. De plus, les effecteurs ont été détectés chez les différentes souches par PCR dans notre étude tandis que la méthode choisie par Guidot *et al.* est l'hybridation des gènes sur des sondes sur puce à ADN. Ce sont donc seulement des fragments de gènes qui sont détectés. Ces différences méthodologiques pourraient expliquer les différences d'association gène/phénotype observées.

Le choix des gènes associés à des phénotypes tranchés ne permet cependant pas toujours d'expliquer la répartition des souches au phénotype intermédiaire. En effet, certaines souches peu agressives sont retrouvées dans le même cluster que des souches très agressives. Par exemple, la souche 59 appartenant à la classe de virulence 2 sur T5, est localisée dans le même cluster que les souches 17, 147 et 941 qui appartiennent aux classes de virulence 4 et 5 d'après la présence/absence des gènes PTO3558, PTO3560, RSc0826 et RSp1130 (Figure 25).

Ceci pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- le répertoire d'effecteurs de chaque souche est basé sur la présence/absence de 25 gènes sur les 94 effecteurs connus à ce jour. Certaines informations qui expliqueraient la différence de virulence entre ces souches pourraient donc manquer.
- les gènes associés à de la virulence et présents chez une souche avirulente pourraient présenter du polymorphisme de séquence qui affecterait leur expression ou conduirait à la production d'une protéine non fonctionnelle
- Le gène présent chez une souche avirulente peut être effectivement présent et identique au gène des souches virulentes mais son expression serait modulée.

III. Bilan sur la méthodologie adoptée

1. Reproductibilité des données des deux inoculations

Il aurait été préférable de tester l'ensemble des souches lors d'une première inoculation et de répéter cette inoculation à une deuxième date, mais les contraintes temporelles ne l'ont pas permis. Afin de pouvoir comparer les données obtenues pour l'ensemble des souches, RUN 17 a été utilisée aux deux dates et un test statistique a permis de montrer la reproductibilité des données aux deux dates.

2. Les apports du séquençage des gènes présents à la fois chez des souches virulentes et avirulentes

Par manque de temps, le séquençage des gènes présents à la fois chez des souches virulentes et avirulentes n'a pas pu être réalisé. Cependant, ceci aurait permis d'obtenir différentes informations importantes, notamment vérifier si la virulence observée chez des souches possédant des effecteurs plutôt liés à de l'avirulence, ou l'avirulence observée chez des souches possédant des effecteurs plutôt liés à de la virulence, s'expliquent par du polymorphisme de séquence. Si tel est le cas, il aurait été intéressant de comprendre si les mutations sont liées à l'ajout de séquences insertionnelles ou à des mutations anti-sens. Si aucun polymorphisme de séquence n'est observé, il est probable que le gène en question n'a pas d'effet majeur dans la détermination de la pathogénicité de la bactérie.

IV. Originalité de cette étude et le bilan sur les effecteurs de type 3 connus

1. L'originalité et les apports de cette étude

Cette étude vient donc en complément de celle basée sur les données de Lebeau *et al.* (2010) et de Guidot *et al.* (2007). Elle permet de valider l'association de certains gènes à un phénotype : virulence ou avirulence et d'affiner l'association de ce phénotype à un cultivar. De plus, c'est la première étude qui permet de comprendre la répartition d'autant d'effecteurs (25 effecteurs au total) dans une large gamme de souches (48 souches) chez *R. solanacearum*.

L'ensemble des souches étudiées appartiennent à deux collections. L'étude de la première, mondialement connue, permet de comprendre la composition en T3Es et le phénotype de souches dont certaines sont très largement étudiées (GMI1000) ; les résultats obtenus permettent donc de compléter les connaissances sur ces souches. La compréhension du contenu en effecteurs et du phénotype de souches appartenant à la seconde collection (collection naturelle de souches récoltées sur l'île de la Réunion) révèle que des souches originaires de zones géographiquement très proches peuvent présenter une diversité phylotypique, génotypique et phénotypique importante.

Par exemple la souche RUN941 (phylotype IIB prélevée sur pomme de terre) semble particulièrement agressive sur tomate et aubergine résistantes tandis que les souches RUN59 et RUN523 (respectivement du phylotype IIB et III et également prélevées sur pomme de terre) sont avirulentes sur les cultivars résistants.

Cette étude a également l'intérêt de caractériser le phénotype d'une collection de souches sur espèces cultivées et non pas seulement sur plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana* ou *Medicago truncatula*.

2. Bilan sur les gènes connus

popW (RSc2775 dans cette étude) a été amplifié au sein de la collection de bactéries et apparaît chez toutes les souches avec 3 allèles différents : un premier allèle présent chez toutes les souches des groupes 1, 2, 3 et 6. Cet allèle est aussi retrouvé chez une souche du groupe 4 et deux souches du groupe 5. Un deuxième allèle présent uniquement dans le groupe 4 (souches du phylotype III) et le troisième allèle est retrouvé chez le groupe 5 (souches du phylotype I) (Tableau 10). Ces données confirment les résultats de Li *et al.*, 2010, qui ont également détecté 3 allèles dans une collection de 20 souches dans laquelle *popW* est conservé. Ce gène serait donc largement conservé chez les souches de *R. solanacearum*. Sa fonction ne semble pas essentielle à la virulence sur Solanacées et ni à la capacité d'induction d'une HR de *R. solanacearum*, car la mutation de ce gène n'entraîne pas de modification de la virulence de la souche mutante. Son rôle serait donc principalement lié à la survie du pathogène, comme semble l'indiquer sa localisation sur le chromosome, proche de gènes essentiels à la bactérie (Li *et al.*, 2010).

Dans notre analyse, les gènes ***AWR2* et *AWR4*** sont détectés chez toutes les souches testées et représentés par un seul allèle. La famille AWR composée de *AWR1*, *AWR2*, *awr3*, *AWR4* et *AWR5* est en cours d'étude par Solé *et al.*, 2010 sur *Nicotiana Benthamiana* principalement. Le gène *AWR6* (PTO1391) que nous avons associé à de la virulence sur E1 (un cultivar résistant d'aubergine) et présent chez des souches du groupe 1, 2, 3 et 6, absent du génome de GMI1000 n'a pas été pris en compte dans leur étude. Selon Solé *et al.*, la délétion de *AWR2* (RSp0099) rend GMI1000 (RUN 54) moins virulente sur tomate. Cependant, nous avons détecté ce gène chez toutes les souches, y compris les souches avirulentes sur tomate. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les cultivars de tomate utilisés sont différents ; ou par du polymorphisme de séquence de ce gène qui induirait une inactivation de ce gène chez les souches avirulentes ou qui générerait une protéine non fonctionnelle. Une autre hypothèse serait que l'effet de ce gène est atténué par la présence et l'activation d'autres effecteurs de type 3.

Le gène *popP1* (RSc0826) a été détecté avec un seul allèle chez des souches du phylotype I et du phylotype III. Chez les sept souches du phylotype I, quatre d'entre elles possèdent *popP1* tandis qu'il n'est pas détecté chez les trois autres. De même dans l'étude de Liu *et al.* (2009), *popP1* a été détecté chez 10 souches de phylotype I sur 22 et associé à de l'avirulence sur tabac (*Nicotiana tabacum*). Dans notre étude, *popP1* est également associé à de l'avirulence sur T5 (le cultivar résistant de tomate).

popP2 est un gène associé à de l'avirulence sur E6 selon nos analyses. Dans l'étude de Deslandes *et al.*, 2003, ce gène est également associé à de l'avirulence mais sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. L'effecteur PopP2 est reconnu par la protéine de résistance d'*A. thaliana* RRS1-R, ce qui active les défenses de la plante et lui permet de lutter contre la bactérie.

Les gènes *GALA3* (RSp0028), *GALA4* (RSp1800) et *GALA5* (RSp1801) utilisés dans cette étude sont principalement présents chez des souches avirulentes (figures 25, 26, 27) tandis que Angot *et al.*, 2006, associent ces gènes à de la virulence sur *Arabidopsis* et tomate via l'interaction avec les protéines végétales SKP1-like. Ces différences s'expliqueraient par le fait que les plants testés dans leur étude sont des cultivars sensibles contrairement à notre étude qui se base sur des cultivars résistants et sensibles. De plus, d'après Poueymiro et Genin, 2009, ces gènes sont conservés dans le complexe d'espèces de *R. solanacearum* alors que dans notre étude, les gènes *GALA4* et *GALA5* sont retrouvés uniquement chez des souches du phylotype I et III. *GALA3* est plus largement répandu dans la collection de souches, mais un fort polymorphisme de longueur est observé et ce gène n'est pas présent chez les souches émergentes (RUN16, RUN17 et RUN18). Les différences de répartition de *GALA4* et *GALA5* observées pourraient être liées à la collection analysée : notre collection de 48 souches contient beaucoup de souches du phylotype IIB séquévar 1 tandis que la collection d'Angot *et al.* est composée de 45 souches représentatives de la biodiversité dans le complexe d'espèce.

V. Perspectives de l'étude

Il pourrait tout d'abord être intéressant de valider les phénotypes associés aux T3Es retenus dans cette étude en testant des souches de la collection qui contiennent ces effecteurs et dont on ignore le phénotype.

A court terme, la première perspective de ce travail sera de séquencer les gènes présents à la fois chez les souches virulentes et avirulentes. Ceci permettra donc (i) de vérifier si les différences phénotypiques observées s'expliquent par du polymorphisme de séquence d'un effecteur particulier ou si cet effecteur n'a pas d'effet majeur dans la virulence de la bactérie ; (ii) d'identifier les effecteurs sous sélection en déterminant le rapport dN/dS (rapport entre le nombre de mutations non synonymes, dN et le nombre de mutations synonymes, dS). Si dN/dS est supérieur à 1, cela signifie que l'effecteur en question est sous pression de sélection diversifiante. Si dN/dS est inférieur à 1, le gène en question serait donc sous sélection purificatrice, ce qui suggérerait un rôle majeur dans la pathogénicité. C'est sur la ou les cibles végétales de cet effecteur que la stratégie de résistance variétale doit être orientée.

Ceci constitue donc une nouvelle perspective de cette étude. L'identification des cibles végétales des effecteurs associés à de la virulence ou de l'avirulence et la compréhension de leurs interactions permettrait de mieux orienter les stratégies de lutte. Un autre objectif en lien avec la lutte serait de comprendre lors de quelles phases de l'infection interviennent les différents effecteurs étudiés. Ceci pourrait être réalisé par génomique fonctionnelle en construisant des mutants dans lesquels les gènes codant pour les différents effecteurs sont inactivés.

Enfin, les effecteurs associés à des phénotypes tranchés pourraient être utilisés comme marqueurs de virulence dont l'évolution pourrait être suivie au sein d'une population naturelle sous pression de sélection ou non, afin d'évaluer la durabilité de la résistance de différents fonds génétiques.

Bibliographie

- Abd El-Ghafar, N (1998). Control of potato bacterial wilt using crop rotation. *Annals. Agr. Sci.*, **43**, 575-587.
- Andrivo, D (1995). Nomenclature for pathogenicity and virulence: precision vs. tradition. *Phytopathology*, **85**, 518-519.
- Angot, A, Peeters, N, Lechner, E, Vailleau, F, Baud, C, Gentzbittel, L, Sartorel, E, Genschik, P, Boucher, C and Genin, S (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain containing type III effectors to promote disease on several host plants. *PNAS*, **103**, 14620–14625.
- Arnold, R, Brandmaier, S, Kleine, F, Tischler, P, Heinz, E, Behrens, S, Niinikoski, A, Mewes, H, Horn, M and Rattei, T (2009). Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathogens*, **5**, 1-13.
- Buddenhagen, I. and Elsasser, T. (1962). An insect-spread bacteria wilt epiphytotic of Bluggoe banana. *Nature*, **194**, 164-165.
- Buddenhagen, I, Sequeira, L and Kelman, A (1962). Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, **52**, 726.
- Carmeille, A, Caranta, C, Dintinger, J, Prior, P, Luisetti, J and Besse, P (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Gen.*, **113**, 110-121.
- Collmer, A, Schneider, D and Lindeberg, M (2009). Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens. *Plant Physiol.*, **150**, 1623–1630.
- Cunnac, S, Boucher, C and Genin, S (2004). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.*, **186**, 2309–2318.
- Denny, T (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam Ss, ed. *Plant-associated bacteria. Dordrecht, the Netherlands: Springer*, 573-644.
- Denny, T, Brumby, S, Carney, B, Clough, S and Schell, M (1994). Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C Hayward and G. L. Hartman, 137-143.
- Denny, T, Carney, B and Schell, M (1990). Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *MPMI*, **3**, 293-300.
- Deslandes, L, Olivier, J, Peeters, N, Feng, D, Khounloham, M, Boucher, C, Somssich, I, Genin, S and Marco, Y (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS*, **100**, 8024–8029.
- Fegan, M and Prior, P (2005). How Complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, edited by C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward. APS Press, St Paul, USA, 449-461.
- Galan, J and Collmer, A (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.
- Genin, S. and Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**, 107-134.
- Gillings, M. and Fahy, P. (1994). Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, Edited by A.C Hayward & G.L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International, 95-112.
- Gonzales, E and Allen, C (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *MPMI*, **16**, 536-544.

- Granada, G and Sequeira, L (1983). Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canad. J. Microbiol.*, **29**, 433-440.
- Grandt, S, Fischer, E, Chang, J, Mole, B and Dangl, J (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**, 425-449.
- Greenberg, J and Vinatzer, B (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opin. Microbiol.*, **6**, 20-28.
- Guidot, A, Coupat, B, Fall, S, Prior, P and Bertolla, F (2009). Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *The ISME Journal*, 1-14.
- Guidot, A, Prior, P, Schoenfeld, J, Carrère, S, Genin, S and Boucher, C (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* **189**, 277-287.
- Hayward, A (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Appl. Bacteriol.*, **27**, 265-277.
- He, L, Sequeira, L and Kelman, A (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease*, **67**, 1357-1361.
- Hogenhout, S, Van der Hoorn, R, Terauchi, R and Kamoun, S (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *MPMI*, **22**, 115-122.
- Hueck, C (1998). Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 379-433.
- Jones, J and Dangl, J (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Kelman, A (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology*, **44**, 693-695.
- Kelman, A and Sequeira, L (1965). Root to root spread of *Pseudomonas solanacearum*. A literary review and bibliography. *Phytopathology*, **55**, 304-309.
- Lavie, M, Seunes, B, Prior, P and Boucher, C (2004). Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. *MPMI*, **8**, 931-940.
- Lebeau, A, Daunay, M, Frary, A, Palloix, A, Wang, J, Dintinger, J, Chiroleu, F, Wicker, E and Prior, P (2010). Bacterial wilt resistance in tomato, eggplant and pepper: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology*, accepted.
- Li, J, Liu, H, Chen, L, Gu, C, Allen, C and Guo, J (2010). *PopW* of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting plant cell wall. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 371-381.
- Liu, H, Kang, Y, Genin, S, Schell, M and Denny, T (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, **147**, 3215-3229.
- Liu, Y, Kanda, A, Kiba, A, Hikichi, Y and Ohnishi, K (2009). Distribution of avirulence genes *avrA* and *popP1* in 22 Japanese phylotype 1 strains of *Ralstonia solanacearum*. *J. Gen. Plant Pathol.*, **75**, 362-368.
- Mc Carter, S. (1991). Bacterial wilt. In Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E. and Zitter T.A. (ed.). *Compendium of tomato diseases*, 28-29.
- McDonald, B and Linde, C (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**, 349-379.
- Melo, M, Takatsu, A, Uesugi, C, Furuya, N and Matsuyama, N (1999). *Ralstonia solanacearum* isolates in root systems of various crops. *Bull. Instit. Tropic. Agric.*, **22**, 45-50.
- Michel, V, Hartman, G and Midmore, D (1996). Effect of previous crop on soil populations of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. *Plant Disease*, **80**, 1367-1372.
- OEPP (1990). Norme OEPP PM 3/26 *Ralstonia solanacearum*, méthodes d'inspection et de test. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **20**, 255-262.
- OEPP (2003). Norme OEPP PM 9/3 Système de lutte national réglementaire pour *Ralstonia solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*.

- Pegg, K and Moffet, M (1971). Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, **11**, 696-698.
- Ponciano, G, Ishihara, H, Tsuyumu, S and Leach, J (2003). Bacterial effectors in plant disease and defense: keys to durable resistance? *Plant Disease*, **87**, 1272-1282.
- Poueymiro, M and Genin, S (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opin. Microbiol.*, **12**, 44-52.
- Poussier, S (2000). Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum. *Thèse de doctorat, Université de Rennes I*, 130pp.
- Poussier, S, Thoquet, P, Trigalet-Demery, D, Barthet, S, Meyer, D, Arlat, M and Trigalet, A (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular microbiol.*, **49**, 991-1003.
- Remenant, B, Coupat-Goutaland, B, Guidot, A, Cellier, G, Wicker, E, Allen, C, Fegan, M, Pruvost, O, Elbaz, M, Calteau, A, Salvignol, G, Mornico, D, Mangenot, S, Barbe, S, Médigue, C and Prior, P (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, **11**, 379.
- Salanoubat, M, Genin, S, Artiguenave, F, Gouzy, J and Mangenot, S (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.
- Schell, M (1996). To be or not to be: how *Pseudomonas solanacearum* decides whether or not to express virulence genes. *Eur. J. Plant Pathol.*, **102**, 459-469.
- Solé, M, Ehonen, S, Deslandes, L, Genin, S and Valls, M (2010). AWR gene family from *Ralstonia solanacearum* is involved in plant cell-death. In: Verdier V, ed. *Proceedings of the 9èmes rencontres Plantes-Bactéries d'Aussois, 2010*, **Aussois, France: SFP-CIRAD-INRA-IRD**, 56.
- Taghavi, M, Hayward, C, Sly, L and Fegan, M (1996). Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 10-15.
- Tan Kersten, J., Yagfeen and Allen, C. (1998). *Ralstonia* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Applied Environ. Microbiol.*, **64**, 4918-4923.
- Tans-Kersten, J, Huang, H and Allen, C (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.*, **183**, 3597-3605.
- Thoquet, P, Olivier, J, Rogowsky, P, Laterrot, H and Grimsley, N (1996). Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. *MPMI*, **9**, 826-836.
- UE. (1998). Directive 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum*. *Journal officiel des communautés européennes*, **235**, 1-39.
- Valls, M, Genin, S and Boucher, C (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, **2**, 798-807.
- Vasse, J, Frey, P and Trigalet, A (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI*, **8**, 241-251.
- Wallis, F and Truter, S (1978). Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Plant Pathol.*, **13**, 307-317.
- Waterhouse, A, Procter, J, Martin, D, Clamp, M and Barton, G (2009). Jalview version 2: A multiple sequence alignment and analysis Workbench. *Bioinformatics*, **25**, 1189-1191.
- Wicker, E (2004). Lutte intégrée contre les maladies telluriques en cultures maraîchères. *PRAM, Cirad, Martinique*.
- Wicker, E, De Cambiaire, J and Prior, P (2010). A MLSA-MLST scheme to investigate the evolutionary dynamics within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Communication, ICPPB, St Denis de la Réunion, 7-11 juin 2010*.

- Wicker, E, Grassart, L, Coranson-Beaudu, R, Mian, D, Guilbaud, C, Fegan, M and Prior, P (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6793-6801.
- Wicker, E, Grassart, L, Coranson-Beaudu, R, Mian, D and Prior, P (2009). Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathol.*, **58**, 853-861.
- Wroblewski, T, Caldwell, K, Piskurewicz, U, Cavanauh, K, Xu, H, Kozok, A, Ocha, O, McHale, L, Jelenska, J, Castillo, J, Blumenthal, D, Vinatzer, B, Greenberg, J and Michelmores, R (2009). Comparative large-scale analysis of interactions between several crops species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. *Plant Physiol.*, **150**, 1733-1749.
- Yabuuchi, E, Kosako, Y, Yano, I, Hotta, H and Nishiuchi, Y (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal for *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia eutropha*. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 897-904.
- Yabuuchi, E, Kosato, Y, Oyaizu, H, Yano, I, Hotta, H, Hashimoto, Y, Ezaki, T and Arakawa, M (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1251-1275.
- Yu, J (1999). Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* infection in tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 2409-2417.

Sitographie

- Magnifying Genomes, (consulté le 01/04/10) *Web interface system and specialized databases for (re)annotation an analysis of microbial genomes*. <http://genoscope.cns.fr/microscope/mage>
- Genestudio, (consulté le 01/04/10) GeneStudio. Inc. *Molecular Biology Software*. www.genestudio.com
- Primer 3, (consulté le 01/04/10) <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org.

Liste des annexes

Annexe I : Composition des milieux de mise en culture

Annexe II : Protocole d'extraction d'ADN bactérien par le kit DNeasy (QIAGEN)

Annexe III : Dessin d'amorces à partir de l'alignement d'un ensemble de gènes orthologues, exemple de PTO3560

Annexe IV : Récapitulatif des amorces utilisées, des protocoles et du polymorphisme observé

Annexe I : Composition des milieux de mise en culture

Préparation du milieu Kelman (pour 1 litre de milieu):

Ingrédients	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycerine	6.3 g
NaOH, N	1.7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphenyltetrazolium	25 mg
Tilt	80µL

Préparation du milieu Sequeira (pour 1 litre de milieu) :

Ingrédients	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycerine	6.3 g
NaOH, N	1.7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphenyltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL
Cristal violet	3 mg
Polymixine B Sulfate	10 mg
Tyrothricine	20 mg
Chloramphénicol	5 mg
Pénicilline	20 unités

Préparation du bouillon nutritif (pour 1 L de bouillon):

Ingrédients	Dose
« 64065 » (BIO RAD) Nutrient broth	13 g
Eau osmosée	1 L

Annexe II : Protocole d'extraction d'ADN bactérien par le kit DNeasy (QIAGEN)

Ce protocole est dérivé de la notice QIAGEN : Appendix D – Extraction of gram-negative bacteria. + Purification of total DNA.

Le protocole recommande de travailler sur 2×10^9 cellules maximum, sur des suspensions bactériennes de préférence jeunes, issues de cultures de moins de 2 jours. Le protocole utilisé est celui utilisé pour la purification de l'ADN à partir de tissu animal.

Cultures solides

- Raclage de chaque boîte, transfert en 1 mL H₂O HPLC (stérilisée aux UV)
- Centrifugation 6500 rpm / 6 min, à 4°C
- Rinçage 400 µL NaCl 1M (pas obligatoire)
- Élimination du surnageant et ajout de 180 µL de tampons ATL.

1) Ajouter 20 µL de protéinase K vortexer et incuber **2H** minimum. à **56°C** au thermomixer avec des agitations occasionnelles (2 mn toutes les 15 mn environ à environ 1000 rpm)

2) Variante : 1 nuit à T° ambiante

La lyse est complète au bout de 1 à 3 heures en fonction des échantillons. Certains échantillons peuvent être incubés pendant 1 nuit. Après incubation, la lyse doit être matérialisée par un aspect visqueux mais non gélifique car cela obstruerait la colonne

3) Phase avec RNase A :

- 7 µL de RNase A à 30 mg.mL⁻¹ (ou 21 µL à 10 mg.mL⁻¹)
- Incubation 2 min à t° ambiante

4) Vortexer 15 s et ajouter **200 µL de tampon AL**. Vortexer immédiatement

Un précipité blanc peut apparaître après addition du tampon. Ce précipité disparaîtra au cours de l'incubation. Le produit de lyse peut être gélifique. Dans ce cas, agiter vigoureusement ou vortexer jusqu'à disparition.

5) Ajouter **200 µL d'éthanol (96-100%)** et vortexer.

Il est important d'agiter vigoureusement afin d'obtenir une solution homogène. Dans le cas où un précipité blanc se forme, il faut absolument le transférer sur la colonne d'élution.

6) Pipeter le mélange obtenu et le déposer sur la colonne d'élution placée sur un tube de 2 ml fourni dans le kit. Centrifuger à **6000g** (8000rpm) pendant **1min**. Séparer la colonne du tube.

7) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 ml (fourni dans le kit), ajouter **500 µL de tampon AW1** et centrifuger à **6000g pendant 1min**. Séparer la colonne du tube.

8) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 ml (fourni dans le kit), ajouter **500 µL de tampon AW2** et centrifuger à 17968 g (vitesse max) pendant 4min afin d'assécher la membrane. (*Protocole initial : centrifugation à 20000g pendant 3min.*) Séparer la colonne du tube.

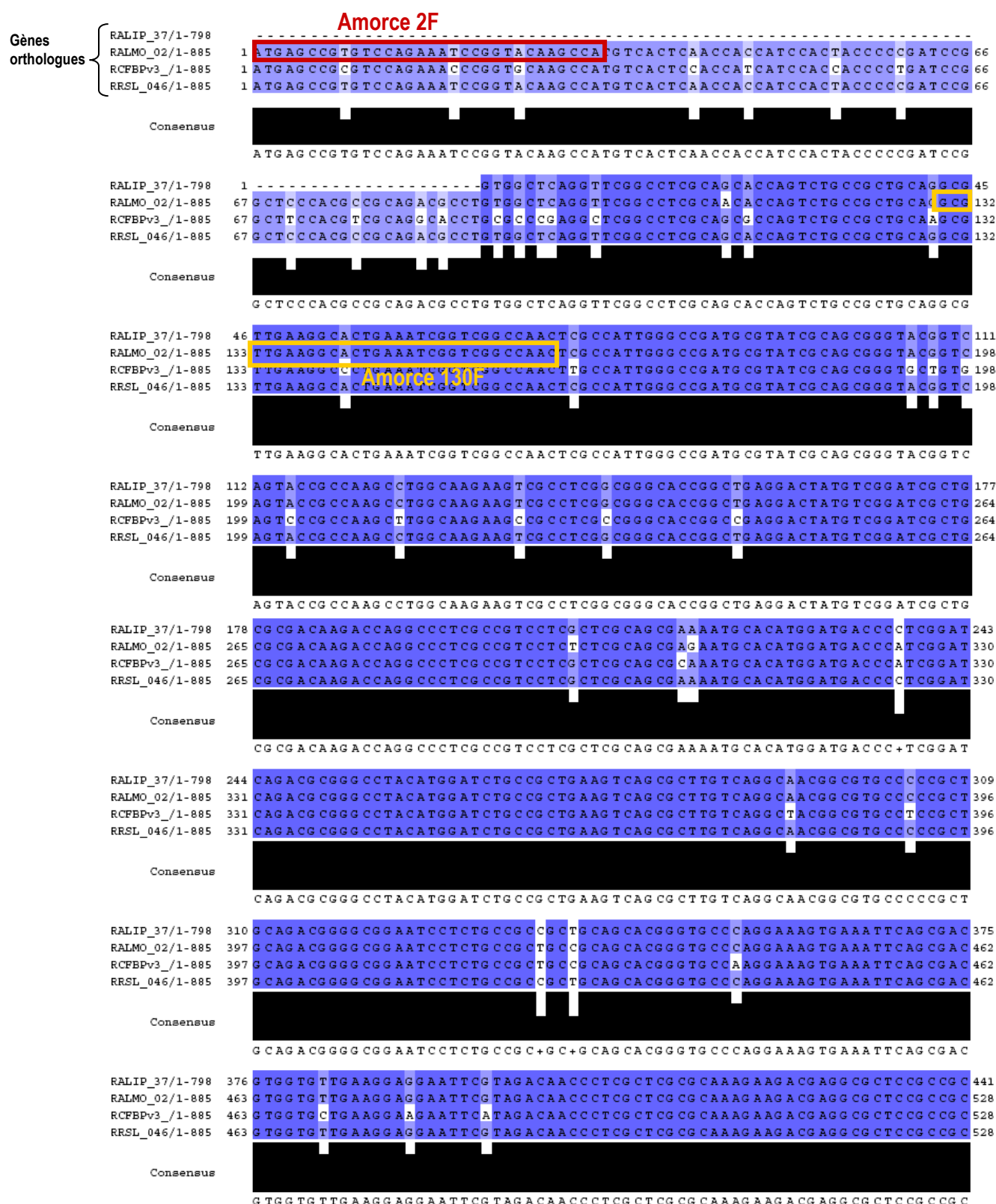
La centrifugation permet d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Si l'on observe des traces d'éthanol dans le tube, changer de tube et centrifuger de nouveau à 20000g pendant 1min.

9) Placer la colonne sur un tube de 2 mL (non fourni dans le kit) et ajouter **200 µL de tampon AE** (élution) sur la colonne. Incuber **1min à température ambiante** et centrifuger à **6000g pendant 1 min**.

10) Renouveler l'élution 1 fois sur un nouveau tube, puis transférer le contenu dans le premier tube. Stocker les tubes en cryoboîte. Ces ADN extraits sont conservés à -20°C.

Annexe III : Dessin d'amorces à partir de l'alignement d'un ensemble de gènes orthologues, exemple de PTO3560

Après alignement des gènes orthologues, deux couples d'amorces ont été dessinés pour amplifier PTO3560



RALIP_37/1-798	442	AGCTCGAGCATCCGTCTCGGATCTCCCAATGGTT	CAGGGGCTTATGTGCATCAACGTATCGATCAA	507
RALMO_02/1-885	529	AGCTCGAGCATCCGTCTCGGATCTCCCAATGGTT	CAGGGGCTTATGTGCATCAACGTATCGATCAA	594
RCFBPv3_/1-885	529	AGCTCGAGCATCCGTCTCGGATCTCCCAATGGTT	CAGGGGCTTATGTGCATCAACGTATCGATCAA	594
RRSL_046/1-885	529	AGCTCGAGCATCCGTCTCGGATCTCCCAATGGTT	CAGGGGCTTATGTGCATCAACGTATCGATCAA	594
Consensus		AGCTCGAGCATCCGTCTCGGATCTCCCAATGGTT		
RALIP_37/1-798	508	TTGCGTGCCTCAGAAATTTTCCGGCCGCAAGATAT	TGATCAATCAGCTGGCGCAAGCGTTGAGT	573
RALMO_02/1-885	595	TTGCGTGCCTCAGAAATTTTCCGGCCGCAAGATAT	TGATCAATCAGCTGGCGCAAGCGTTGAGT	660
RCFBPv3_/1-885	595	TTGCGTGCCTCAGAAATTTTCCGGCCGCAAGATAT	TGATCAATCAGCTGGCGCAAGCGTTGAGT	660
RRSL_046/1-885	595	TTGCGTGCCTCAGAAATTTTCCGGCCGCAAGATAT	TGATCAATCAGCTGGCGCAAGCGTTGAGT	660
Consensus		TTGCGTGCCTCAGAAATTTTCCGGCCGCAAGATAT		
RALIP_37/1-798	574	GAAATGGGCGACGCCCATCCGGGAGGCGCTGCAG	CCATCAAGAAAACGCTGGCGAAAAAAGAGCTC	639
RALMO_02/1-885	661	GAAATGGGCGACGCCCATCCGGGAGGCGCTGCAG	CCATCAAGAAAACGCTGGCGAAAAAAGAGCTC	726
RCFBPv3_/1-885	661	GAAATGGGCGACGCCCATCCGGGAGGCGCTGCAG	CCATCAAGAAAACGCTGGCGAAAAAAGAGCTC	726
RRSL_046/1-885	661	GAAATGGGCGACGCCCATCCGGGAGGCGCTGCAG	CCATCAAGAAAACGCTGGCGAAAAAAGAGCTC	726
Consensus		GAAATGGGCGACGCCCATCCGGGAGGCGCTGCAG		
RALIP_37/1-798	640	CCCTCCGACGTGGTGAAGGTGCTTGAAGCCAATGG	CGCGAATACCCGGTCTGGCAGGGCTGCGGTC	705
RALMO_02/1-885	727	CCCTCCGACGTGGTGAAGGTGCTTGAAGCCAATGG	CGCGAATACCCGGTCTGGCAGGGCTGCGGTC	792
RCFBPv3_/1-885	727	CCCTCCGACGTGGTGAAGGTGCTTGAAGCCAATGG	CGCGAATACCCGGTCTGGCAGGGCTGCGGTC	792
RRSL_046/1-885	727	CCCTCCGACGTGGTGAAGGTGCTTGAAGCCAATGG	CGCGAATACCCGGTCTGGCAGGGCTGCGGTC	792
Consensus		CCCTCCGACGTGGTGAAGGTGCTTGAAGCCAATGG		
RALIP_37/1-798	706	ATCAAGCGCTTCAAGGAAGTGGAAAAGGATACCG	CCCAACTCAAGAAGGACGCGCCCAAGCGAA	771
RALMO_02/1-885	793	ATCAAGCGCTTCAAGGAAGTGGAAAAGGATACCG	CCCAACTCAAGAAGGACGCGCCCAAGCGAA	858
RCFBPv3_/1-885	793	ATCAAGCGCTTCAAGGAAGTGGAAAAGGATACCG	CCCAACTCAAGAAGGACGCGCCCAAGCGAA	858
RRSL_046/1-885	793	ATCAAGCGCTTCAAGGAAGTGGAAAAGGATACCG	CCCAACTCAAGAAGGACGCGCCCAAGCGAA	858
Consensus		ATCAAGCGCTTCAAGGAAGTGGAAAAGGATACCG		
RALIP_37/1-798	772	CCACCGCCGCGGAACGAGTCG	CAGTAA	798
RALMO_02/1-885	859	CCACCGCCGCGGAACGAGTCG	CAGTAA	885
RCFBPv3_/1-885	859	CCACCGCCGCGGAACGAGTCG	CAGTAA	885
RRSL_046/1-885	859	CCACCGCCGCGGAACGAGTCG	CAGTAA	885
Consensus		CCACCGCCGCGGAACGAGTCG		

Annexe IV : Récapitulatif des amorces utilisées, des protocoles et du polymorphisme observé

L= Amplification de l'orthologue le plus long ou de l'ensemble des orthologues s'ils sont de la même taille, U= Amplification du fragment universel retrouvé chez tous les orthologues, F= amplification d'un fragment du gène
Les couples d'amorces grisés sont ceux qui n'ont pas permis d'amplifications.

Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm	Taille attendue	Fragment amplifié	Détection de polymorphisme	Tannealing (°C)	Nombre de cycles		
RSp1384_6F	AGTCAATCCACCCGCTTCGCC	60,40	2407	L	-	56	25		
RSp1384_2412R	CAGCTCCGTTTGCAGTTGCC	59,87							
RSp1384_390F	GCCGGTCGTGCGCTTGCT	62,68	2023	U		56	25		
RSp1384_2412R	CAGCTCCGTTTGCAGTTGCC	62,09							
RSp1460_6F	GCTCACACGCACTCCACCC	59,40	812	L	+	56	30		
RSp1460_817R	GCGGCGCTTTCGATGCT	59,59							
RSp1460_274F	CAGCCCGTGCGGACCAAG	60,05	544	U		56	30		
RSp1460_817R	GCGGCGCTTTCGATGCT	59,59							
RSp1582_23F	ACAAGGACTATGGGGAAGACGACGC	60,64	541	L	-	56	30		
RSp1582_563R	TCGCGCAAGGCATCGAGCAAG	61,16							
PTO1326_288F	GCGATGGCTCAAGAAGTCGGCA	60,22	1784	U	-	Pas ou très peu d'amplification			
PTO1326_2071R	GCAGACCCGCGCATTGGA	59,06							
PTO1326_4F	CCAACCTCGCCATTTCACCAG	60,98	2069	L		56	30		
PTO1326_2072R	CGCAGACCCGCGCATTGGA	61,78							
PTO3560_2F	TGAGCCTTTTCAGAAATCCGGT	60,65	858	L	-	56	30		
PTO3560_859R	GTTTCGCTTGGGGCGGCGT	62,52							
PTO3560_130F	GCGTTGAAGGCACTGAAATCGGTCGG	62,68	730	U		57	30		
PTO3560_859R	GTTTCGCTTGGGGCGGCGT	62,52							
PTO3558_24F	GCAATGGGCCGACCACACCAA	61,19	1067	L	-	57	30		
PTO3558_1090R	ATGAGGATGTGGCTCTCCGGCTC	61,23							
PTO1808_50F	TGCGACTGGTGCTGTCCG	58,29	2726	L	-	Présence quasi inexistante d'après données puce et beaucoup d'amplifications aspécifiques			
PTO1808_2775R	CTAGGCGATACGGCTGGCTT	57,05							
PTO1808_2530F	CTGCACCTCGAACGCCTGTA	57,32	244	U					
PTO1808_2773R	AGGCGATACGGCTGGCTTC	57,75							
PTO1265A_26F	TCGATCAAGCCGGGCAAAGCA	59,72	2313	F	-	55	30		
PTO1265A_2338R	CGTTGGCCTTCAGGGTCTCCA	59,66							
PTO1265B_48F	GCCCGCAGTCAACCCGAAC	59,95	3996	L		Fragment trop grand			
PTO1265B_4043R	CCGCCAGGGTGAAACCGAA	60,73							
PTO1265C_1874F	GAGCGAGCCGAGACGAAGGT	59,74	2081	F		56	30		
PTO1265C_3974R	GACCCGAGGAACCCGAGGAG	60,12							
BA7003_36F	CGCTCGGGAACCCCACTTG	59,17	2660	L	+	Pas ou très peu d'amplification			
BA7003_2695R	GCTGCTCCGCGTCGTTGT	59,08							
BA7003_142F	GCGACGAGGTCTGGAGCGAA	59,95	946	U		56	30		
BA7003_1087R	CCGCTTGCTGGACGGGTG	60,05							
RSc1800_126F	GACCATCACGCACCGGGACA	60,37	1051	U	-	56	25		
RSc1800_1176R	GGCCTCCAGTGCCRCAT	61,74							
GALA4CFBP_18F	AATCGGTTGGCTGCCGTCGC	61,63	1358	L		Pas ou très peu d'amplification			
GALA4CFBP_1375R	YWYKKYCAGCGTGKYRYTGCCCK	61,38							
RSc1801_75F	CGGCTCGTCGCTCCTGCAA	61,13	1404	L	-	56	30		
RSc1801_1478R	GACGACAGCGTGCGTTGG	60,02							
GALA5univ_219F	CGYCAGCAAGCCGGTGAAG	60,15	1270	U		Pas ou très peu d'amplification			
GALA5univ_1488R	CACGCCGAGCGACGACAG	59,76							

Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm	Taille attendue	Fragment amplifié	Détection de polymorphisme	Tanniling (°C)	Nombre de cycles
RSc2775IIB1_2F	TGCTACGCGCCTCATCCGAG	60,09	1202	L	+	56	30
RSc2775IIB1_1203R	GGCCTTGTAGCTCACCTTGTGGT	59,38					
RSc2775univ_76F	GATCGCCCCGAGTGACCATTTC	59,38	1119	U		56	30
RSc2775univ_1194R	GCTCACCTTGTGGTGCCCG	59,69					
RSp0099_176F	GACCCGCCCATCAACG	60,35	3065	L	-	56	25
RSp0099_3240R	GGTGTAGCCGTGCGTGGTGA	60,52					
RSp0099_204F	GCCGGGCTTACCAAGACGA	60,63	1092	F		56	30
RSp0099_1295R	AGCAGGCCGAGGTTGGCG	61,8					
RSp0099_1279F	GCCAACCTCGGCCTGCTGAA	61,01	1045	F		56	30
RSp0099_2323R	TGTCGGGCGTGCGGAAGAAG	60,76					
RSp0296_10F	AATCGCACCCACGCAACCT	60,05	2200	F	+	56	30
RSp0296_2209R	CGCTCAGGGCGTTGCTCAC	59,89					
RSp0296_2184F	GCAAAGCGTGAGCAACGCC	60,83	2350	F		Beaucoup d'amplifications aspécifiques	
RSp0296_4533R	CTTCCAGCGCGACAGCACC	59,89					
RSp0296_4513F	AAGGTGCTGTGCGCTGGAA	59,88	2298	F		55	30
RSp0296_6854R	TCCCGGACTTTCTCGTAATCCCTGT	60,02					
RSp0847_179F	CCCTCRTYGGYGCCAGCAAGYAT	59,29	2871	L	-		
RSp0847_3049R	CCATGTGCGAGAAGACCTTGAACCTC	59,58					
RSp0847_3015F	GGCCGAGCAGGAGTTCAAGGT	59,91	960	U		56	30
RSp0847_3974R	GCCTCGCTGGTGCCGTACA	60,96					
RSp0854_11F	GCGGCTCYCTCCGTYYCCC	58,94	211	L	+	55	30
RSp0854_221R	AGCAGRTCCTTGCGSGCCTT	59,45					
RSp0854univ_38F	YGRYRGAYCCGAVCGSCAT	60,27	185	U		55	30
RSp0854univ_222R	GAGCAGRTCCTTGCGSGCCTT	60,3					
RSp1130_123F	CTCGGACGTGACCAGCAACCT	59,72	1231	L	-	56	30
RSp1130_1353R	CGTCTCCCCGGCCTTCAACT	59,93					
RSc1723_55F	GCCACATTCGAGGATGCCGATGATT	59,46	250	L	-	55	30
RSc1723_304R	TTTTCTTTGGGGCGCTGTCGATTG	58,09					
AWR6_RALIP_1572F	GCAGCGTGTGTTCTCGCACC	59,96	1224	F	-	Pas ou très peu d'amplification	
AWR6_RALIP_2795R	TCCCCGCCATCCGTCTTCAC	59,97					
AWR6_RALIP_466F	GCCCGTCCGTCTATCCCATTC	60,17	1582	F		56	30
AWR6_RALIP_2047R	ACACCGTTTCCTTGCCATCCACC	60,08					
AWR6_RALIP_2020F	CGGTGCGTGGATGGCAAGGAAA	60,09	1579	F		Pas ou très peu d'amplification	
AWR6_RALIP_3598R	TCGTCCAGGCGTCCGAAATGG	60,04					
BA2498_5F	CGGAACGAGACCCTGCGGAAA	59,97	375	F	-		
BA2498_379R	TGCGTGAACCTCGATGCGACCTG	60,04					
BA2498_5F	CGGAACGAGACCCTGCGGAAA	59,97	464	L		56	30
BA2498_468R	GGGATGTTGGGATTGCTGACGAGA	58,98					
RSp0572_60F	CGAAGCTGACCGTTATGCGGG	58,86	468	L	-	55	30
RSp0572_527R	CCTGCCTCGCTGGTTTCGTTG	59,31					
PopP2_8F	ATCCTTTGCCGGGGCGCA	60,91	982	L	+	56	30
PopP2_989R	TTGCGTTTGACGAGATGGCGGG	60,62					
PopP2_4F	GATCATCCTTTGCCGGGGCG	59,39	922	L			
PopP2_925R	CGGTTGACTGCTCGGGATGGT	59,77					
PopP2_430F	ATCGCTGAGTTCGTTGCGTCGG	60,23	496	U			
PopP2_925R	CGGTTGACTGCTCGGGATGGT	59,87					

Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm	Taille attendue	Fragment amplifié	Détection de polymorphisme	Tanniling (°C)	Nombre de cycles		
PTO7001_RALIP_7F	CAACGGTCTGCGCGTGCTC	60,27	413	U	-	56	25		
PTO7001_RALIP_419R	CATCTCCGCATCGACCTGTAGCG	60,08							
PTO7001_RALMO_9F	GGCGTGGGAGGTCGGTCA	60,57	532	L					
PTO7001_RALMO_540R	ACGCGACGACAAGACAGGAGG	59,61							
PTO4834_RALIP_15F	GGCGCTGAATCTCTCGTATCACGG	59,81	1152	L	+	56	30		
PTO4834_RALIP_1166R	TCGCGCCGGGCTTCTCTTT	60,06							
PTO4834_RALIP_323F	GCAGAGGTCTACCGATCCCC	59,73	844	U				56	30
PTO4834_RALIP_1166R	TCGCGCCGGGCTTCTCTTT	59,99							
popP1_19F	GCATTGGGCGTCAGTCAACCG	59,59	1088	L	-	55	30		
popP1_1106R	CACGACTCCAGGGCATGTGCGAA	59,5							
GALA3_CMR_34F	CCGGTCGTGTCCCAGGATGT	59,67	1762	L	+	56	30 Suspension 10 ⁸		
GALA3_CMR_1795R	CCGCCAGCGTCATCAGCTC	59,47							
GALA3_CMR_566F	ACCTGATCGGACTGCCTGCC	60,04	1044	U					
GALA3_CMR_1609R	GGGATTGGCGGAGATTGAGCGT	59,95							
GALA3_CMR_504F	GCGCCCAGGCAGCTATCC	59,76	1294	U					
GALA3_CMR_1797R	GGCCGCCAGCGTCATCAG	60,13							



Centre d'Angers

Institut National d'Horticulture et du paysage

Spécialité : Horticulture

Option : SEVE

Enseignants responsables de l'option : Jean-Charles Michel, Stéphane Poussier

Tuteur : Stéphane Poussier

Auteur(s) : Flora Pensec

Organisme d'accueil : Cirad, Pôle de protection des plantes

Adresse : 7, chemin de l'IRAT
97410 ST PIERRE LA REUNION

Nb pages : 35

Annexe(s) : 4

Maître de stage : Emmanuel Wicker

Année de soutenance : 2010

Exploration des facteurs génétiques liés à la spécificité de virulence de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine et tomate

Résumé :

R. solanacearum est une Beta-protéobactérie à la taxonomie complexe, capable d'infecter 250 espèces hôtes et responsable du flétrissement bactérien sur Solanacées. Pour évaluer la durabilité de résistance aux Solanacées, il semble important de comprendre le rôle des effecteurs de type 3 (T3Es), déterminants majeurs de la virulence de la bactérie, dans le contournement ou l'activation de la résistance des plantes. Cette étude s'attache donc à valider la corrélation entre le contenu en effecteurs bactériens et les propriétés de virulence ou d'avirulence de la bactérie sur tomate et aubergine. Vingt six effecteurs de type 3 putativement associés à la virulence et à l'avirulence ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans une collection de 48 souches bactériennes. Onze souches représentatives de la diversité de répartition des effecteurs ont ensuite été utilisées pour une inoculation en conditions contrôlées sur des cultivars d'aubergine et de tomate résistants et sensibles. Cette étude met en évidence des T3Es conservés chez toutes les souches et des T3Es à répartition variable selon les souches mais également selon la phylogénie. La combinaison des données génotypiques et phénotypiques des souches révèle qu'il n'existe pas de lien direct entre le répertoire entier d'effecteurs et le phénotype d'une souche, mais que certaines combinaisons de gènes seraient hautement associées à un phénotype sur un cultivar donné. Cette étude ouvre donc de nouvelles perspectives sur les stratégies de lutte et l'évaluation de la durabilité de Solanacées des plantes à *R. solanacearum*.

Abstract :

R. Solanacearum is a Beta-proteobacterium with a complex taxonomy, capable of infecting 250 host species and responsible for bacterial wilt on *Solanaceae*. In order to assess *Solanaceae*'s resistance durability, it seems important to understand the functions of type 3 effectors, major determinants of the virulence, in the bypassing or activation of plant resistance. This study attempted to validate the correlation between the bacterial effectors contents and the virulence or avirulence features on tomato and eggplant. Twenty six T3Es putatively virulence or avirulence-associated were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) in a 48 strains collection. Eleven strains representative of the effectors' distribution variability were then used in a pathogenicity test, under controlled conditions, on resistant and susceptible tomatoes and eggplants. This study brings to light core and variable T3Es. The T3Es distribution also matches with the phylogeny of *R. solanacearum*. Combining of the genotypic and phenotypic data reveals that there is no direct link between the whole effectors content and the strains phenotype, but that some gene combinations would be highly associated to a phenotype on a given cultivar. This study raises new prospects for control strategies and resistance durability to *R. solanacearum*.

Mots-clés : *Ralstonia solanacearum*, durabilité de résistance, spécificité de virulence, effecteurs de type 3

Key words : *Ralstonia solanacearum*, resistance durability, virulence specificity, type 3 effectors